



Microbiote intestinal et développement de l'obésité : une approche par métagénomique et métabolomique du concept de répondeur et non-répondeur

Pascal Bally

► To cite this version:

Pascal Bally. Microbiote intestinal et développement de l'obésité : une approche par métagénomique et métabolomique du concept de répondeur et non-répondeur. Bactériologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2015. Français. NNT : 2015PA112085 . tel-01167379

HAL Id: tel-01167379

<https://theses.hal.science/tel-01167379>

Submitted on 24 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Comprendre le monde,
construire l'avenir®

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 435 :
AGRICULTURE, ALIMENTATION, BIOLOGIE, ENVIRONNEMENT ET SANTÉ

Laboratoire : MICALIS UMR1319 Alimentation, Microbiote Intestinal,
Pathologies Encéphaliques et Métaboliques (AMIPeM) (INRA)

THÈSE DE DOCTORAT

SCIENCES AGRONOMIQUES, BIOTECHNOLOGIES AGRO-ALIMENTAIRES

par

Pascal BALLY

**Microbiote intestinal et développement de l'obésité:
Une approche par métagénomique et métabolomique
du concept de répondeur et non-répondeur**

Date de soutenance : 28/05/2015

Composition du jury :

Directeur de thèse :	Philippe GERARD	Directeur de recherche (INRA Jouy-en-Josas)
Rapporteurs :	Marie-José BUTEL Christophe MAGNAN	Professeur (Université Paris Descartes) Professeur (Université Paris Diderot)
Examineurs :	Marion LECLERC Armel GUYONVARCH	Chargée de recherche (INRA Jouy-en-Josas) Professeur (Université Paris Sud)

Remerciements

Je remercie Christophe Magnan et Marie-José Butel d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse et qui ont accepté de lire ce manuscrit.

Je remercie également Marion Leclerc et Armel Guyovarch d'avoir bien voulu faire parti de mon jury.

Je souhaite aussi remercier Jean-Marc Lacorte, Patricia Lepage, Sean Kennedy et Jean-Charles Martin pour avoir fait parti de mon comité de thèse.

Je remercie Philippe Gérard de m'avoir accueilli dans son équipe et de m'avoir confié ce projet de thèse.

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont aidé dans les différentes expérimentations et techniques au cours de ces 3 années. Merci à Aurélia Bruneau pour m'avoir initié à l'expérimentation animale, merci à Catherine Philippe pour m'avoir apporté ses compétences techniques dans le dosage des AGCC. Je remercie aussi Stefan Bouet et Abdelhak Boukadiri pour leur aide précieuse en histologie, leur disponibilité et leur sympathie ainsi que Stéphane Hazebrouck pour m'avoir permis de réaliser les dosages de cytokines. Merci à Mylène Boulay et Lionel Rigottier-Gois pour leurs explications sur la FISH-FCM.

Je remercie Jean-Charles Martin pour m'avoir accueilli dans son équipe à Marseille, et m'avoir initié au monde étrange de la métabolomique. D'énormes appareils pour de minuscules molécules, c'est toute la beauté de la métabo ! Un grand merci également à Christian Ginies pour sa disponibilité et ses compétences techniques dans cet univers de GC/MS, LC/MS, MS/MS et M&M's... Merci également à Nacima Aidoud et Ljubica Silvar pour leur gentillesse et leur bonne humeur. Quand les appareils tombent en rade on se sent moins seul, merci les filles !

Un grand merci à Emmanuel Le Chatelier pour avoir consacré de son temps aux analyses des données de métagénomique et nous avoir guidé dans l'interprétation des résultats.

Je remercie Bénédicte Langelier pour sa disponibilité et son expertise en qPCR. Des extractions d'ARN avec Neil Young ça fonctionne tout de suite mieux !

Merci à Patricia Anglade et Valérie Dugé pour leur soutien morale et pour toutes nos discussions ! Merci également à mes amis et collègues, du labo ou d'ailleurs, pour les bons moments passés ensemble ! Ils se reconnaîtront.

Merci enfin à toi, ma chère et tendre Clémentine pour ton amour, ta patience, ton dévouement, tes encouragements et ton soutien sans faille. Je te dédie ce travail, en espérant te rendre aussi fier que je le suis de toi. « On se demande parfois si la vie a un sens... et puis on rencontre des êtres qui donnent un sens à la vie... » (Brassai).

Remerciements.....	2
Table des figures	8
Table des tableaux.....	11
Liste des abréviations	12
I. INTRODUCTION	15
1. L'obésité : Etat des lieux.....	16
1.1. L'obésité à travers le monde.....	16
1.2. L'obésité en France.....	16
1.3. Coût de l'obésité.....	18
1.4. Les pathologies associées à l'obésité.....	18
1.5. Obésité et balance énergétique	20
2. Les modèles d'obésité.....	22
2.1. Les modèles génétiques.....	22
2.2. Régimes riches en lipides et obésité induite	23
2.2.1. Les différents types de régimes hyperlipidique.....	23
2.2.2. Les effets du régime hyperlipidique sur le développement de l'obésité.....	24
2.3. Les effets physiologiques du régime hyperlipidique	25
2.3.1. Le tissu adipeux.....	25
2.3.1.a. La lipogenèse	26
2.3.1.b. Les adipokines.....	26
i. La leptine	26
ii. L'adiponectine	27
iii. La résistine.....	27
2.3.1.c. Inflammation	28
2.3.1.d. Insulinorésistance	29
2.3.1.e. Facteurs de transcription.....	31
i. PPAR- γ	31
ii. SREBP	31
2.3.2. Le foie	32
2.3.2.a. Stéatose hépatique	32
2.3.2.b. Insulinorésistance hépatique.....	32
2.3.2.c. Lipogenèse <i>de novo</i>	32
2.3.3. L'intestin.....	33
2.3.3.a. Absorption lipidique.....	33
2.3.3.b. Oxydation lipidique.....	34

2.3.3.c. Sécrétion hormonale	34
2.3.4. Le muscle squelettique.....	34
2.3.4.a. Lipotoxicité musculaire.....	35
2.3.4.b. Insulinorésistance	35
2.3.4.c. Inflammation	36
3. Le microbiote intestinal.....	37
3.1. Le microbiote intestinal humain.....	37
3.2. Structure et composition du microbiote intestinal.....	38
3.3. Régulation de la composition du microbiote	43
3.3.1. Facteurs influençant la mise en place du microbiote au cours de l'enfance.....	43
3.3.2. Diversification alimentaire	44
3.4. Influence du microbiote intestinal sur son hôte	45
3.4.1. Fonctions métaboliques du microbiote intestinal.....	45
3.4.1.a. Métabolisme des glucides par le microbiote intestinal.....	45
3.4.1.b. Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal	48
3.4.1.c. Métabolisme des lipides par le microbiote intestinal.....	49
3.4.1.d. Synthèse de vitamines	50
3.4.2. Influence du microbiote intestinal sur le système immunitaire	50
3.4.3 Influence du microbiote sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin.....	53
3.4.4 Influence du microbiote intestinal sur la physiologie du système digestif.....	53
3.5 Microbiote et obésité.....	54
3.5.1. Obésité et dysbiose.....	54
3.5.2 Microbiote et obésité : cause ou conséquence ?.....	56
3.5.2.a. Les animaux axéniques.....	56
3.5.2.b. Transfert de microbiote.....	57
3.5.2.c. Influence du microbiote dans les maladies métaboliques associées à l'obésité	59
3.5.3 Un mécanisme liant microbiote et obésité : l'hypothèse LPS.....	60
3.5.4. Quelles bactéries responsables ?	63
3.5.5 Intérêt potentiel des probiotiques dans le traitement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées	63
3.5.6 Intérêt potentiel des prébiotiques dans le traitement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées	64
3.5.7 Effets des antibiotiques	64
4. Les techniques d'analyses du microbiote.....	66
4.1. Les techniques basées sur la culture.....	66
4.2. Les techniques indépendantes de la culture.....	66
4.2.1. L'ARN ribosomal 16S.....	66
4.2.2. L'hybridation in situ en fluorescence	67

4.2.3. Les techniques d'empreintes	68
4.2.4. Les micro-puces à ADN.....	68
4.2.5. La PCR quantitative	68
4.2.6 Le séquençage de l'ADNr 16S.....	68
4.2.7 La Métagénomique par séquençage de type « shotgun »	69
4.2.8 La métatranscriptomique.....	71
4.2.9 La métaprotéomique	72
4.2.10 La métabolomique.....	72
5. Objectifs du projet de thèse	74
II. MATERIELS & MÉTHODES	75
1. Expérimentation animale	76
2. Histologie	78
3. Dosage des cytokines	78
4. Test de tolérance au glucose.....	80
5. Analyse de l'expression des gènes par qPCR.....	80
6. Hybridation <i>in-situ</i> en fluorescence couplée à la cytométrie en flux (FISH-FCM)	83
6.1. Fixation des échantillons fécaux.....	86
6.2. Perméabilisation	86
6.3. Hybridation	86
6.4 Détection	87
7. Dosage des Acides gras à chaînes courtes (AGCC)	87
7.1. Traitement des échantillons de contenu caecal.....	87
7.2. Dosage des AGCC par CPG.....	87
8. Métagénomique.....	89
8.1. Extraction d'ADN	89
8.2. Préparation de la banque	90
8.3. Technique de séquençage SOLiD	90
8.4. Analyses bioinformatiques	92
8.5. Comptage de gènes	92
8.6. Annotation fonctionnelle des gènes	93
8.7. Annotation taxonomique des gènes.....	93
8.8. Clusterisation du catalogue de gènes en espèces métagénomiques.....	94
8.9. Annotation taxonomique des MGS/CAG à partir de l'annotation des gènes	96
8.10. Recherche des différences d'abondances de gènes entre les groupes de souris R et NR	97
9. Métabolomique.....	99

9.1. Préparation des échantillons.....	100
9.1.1. Urines.....	100
9.1.2. Fèces.....	100
9.1.3. Plasma.....	101
9.2. HPLC-LC/MS.....	102
9.3. MS ESI-TOF.....	104
9.4. Paramètres HPLC.....	108
9.5. Paramètres MS.....	109
9.6. Prétraitement des données (Filtration et détection des pics entre échantillons).....	110
9.7. Analyses des données.....	112
III. RESULTATS.....	114
1. Comparaison des souris contrôles et high fat.....	115
1.1. Gain de poids.....	115
1.2. Efficacité alimentaire.....	115
1.3. Poids des organes.....	115
1.4. Glycémie et test de tolérance au glucose (OGTT).....	117
1.5. Comparaison des souris contrôles et des souris high fat.....	117
1.6. Choix des souris répondeuses et non répondeuses.....	119
2. Comparaison des souris contrôles (CONT), répondeuses (R) et non répondeuses (NR)	121
2.1. Gain de poids et consommation, efficacité alimentaire et poids des organes.....	121
2.2. Histologie.....	123
2.2.1. Coupes histologiques du tissu adipeux inguinal.....	123
2.2.2. Coupes histologiques du foie.....	124
2.2.3 Coupes histologiques de l'iléon.....	124
2.3. Dosages plasmatiques des cytokines et hormones.....	126
2.4. Expression des gènes.....	128
2.4.1. Foie.....	128
2.4.2. Iléon.....	130
2.4.3. Tissu adipeux inguinal.....	132
2.4.4. Muscle gastrocnémien.....	135
2.5. Dosage des AGCC.....	137
2.6. Dosage des lipides plasmatiques.....	140
2.7. Dosage des Lipopolysaccharides (LPS).....	141
3. Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence couplée à la cytométrie en flux.	142
4. Métagénomique.....	144
4.1. Comptage de gènes.....	144
4.2. Regroupement hiérarchique.....	145

4.3. Comparaison du nombre de gènes	149
4.4. Identification des fonctions.....	150
4.5. Analyse taxonomique	152
4.5.1. Comparaison NR/R.....	152
4.5.2. Effet du régime	154
4.6. Différence entre les échantillons au niveau des méta-espèces	158
5. Métabolomique.....	161
5.1. Métabolome fécal avant régime hyperlipidique	161
5.2. Métabolome urinaire avant régime hyperlipidique.....	162
5.3. Métabolome plasmatique avant régime hyperlipidique	163
IV. DISCUSSION & PERSPECTIVES	166
1. Distinction des NR et des R	168
2. Microbiote de prédiction	172
3. Perspectives	175
V. BIBLIOGRAPHIE.....	176

Table des figures

Figure 1 : Prévalence de l'obésité mondiale en 2013.	17
Figure 2 : Facteurs de risque, complications et pathologies associés à l'obésité.	20
Figure 3 : L'homéostasie énergétique dépend de la balance entre l'apport calorique et la dépense énergétique.	21
Figure 4 : Obésité et développement du tissu adipeux – Inflammation résultante et dérégulation métabolique.	29
Figure 5 : Tissu adipeux et insulino-résistance.	30
Figure 6: Anatomie du tractus digestif, principaux phyla bactériens, et leur abondance au sein de chaque niche.	38
Figure 7 : Arbre phylogénétique du microbiote fécal représentant les groupes bactériens les plus souvent détectés.	40
Figure 8 : Les entérotypes.	41
Figure 9 : La redondance fonctionnelle du microbiote intestinal.	43
Figure 10 : Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par le microbiote intestinal.	48
Figure 11 : Production d'IgA par le système immunitaire.	52
Figure 12 : Modulation de la réponse immunitaire par le microbiote intestinal.	52
Figure 13: Le microbiote régule les fonctions métaboliques de l'hôte.	59
Figure 14 : Vue d'ensemble des techniques utilisées afin de caractériser le microbiote intestinal	67
Figure 15 : Composition du régime contrôle et du régime hyperlipidique.	76
Figure 16 : Diagramme de l'expérimentation animale.	77
Figure 17 : Principe des interactions moléculaires du dosage Luminex.	79
Figure 18 : Principe de la méthode TaqMan.	81
Figure 19 : Représentation schématique des principales étapes de l'hybridation <i>in situ</i> en fluorescence.	84
Figure 20 : Représentation schématique du circuit optique du FACSCalibur (Bd Biosciences)	84
Figure 21 : Représentation schématique de la chromatographie en phase gazeuse.	88
Figure 22 : Les grandes étapes d'une analyse de métagénomique quantitative. De la collecte d'échantillons jusqu'au diagnostic.	89
Figure 23 : Principe de la technique de séquençage SOLiD.	91
Figure 24 : Annotation taxonomique des gènes du catalogue du métagénome de la souris.	94
Figure 25 : Clusterisation des gènes en MGS/CAG en fonction de leur profils de co-abondance.	95
Figure 26 : Annotation taxonomique des MGS/CAG.	97
Figure 27 : Représentation schématique de la chaîne analytique en métabolomique par LC/MS.	100
Figure 28 : Schéma d'un montage LC (HPLC)-MS.	103
Figure 29 : Schéma des séquences d'un passage machine en spectrométrie de masse.	104

Figure 30 : Représentation schématisée de l'électronébuliseur (ESI).....	105
Figure 31 : Représentation schématisée d'un quadrupôle en spectrométrie de masse.....	106
Figure 32 : Principe de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol.....	106
Figure 33 : Appareil hybride quadrupole/trappe orbitale (type Q-Exactive).....	107
Figure 34 : Flux de traitements de données mis en œuvre par XCMS.	110
Figure 35 : Chainage bioinformatique CAMERA pour l'analyse des données LC/MS.	112
Figure 36 : Présentation des données lors des analyses multivariées..	113
Figure 37 : Gain de poids, consommation et efficacité alimentaire.	116
Figure 38 : Poids des différents organes mesurés au sacrifice des animaux.	116
Figure 39 : Glycémie et OGTT.....	118
Figure 40 : Analyse en composante principale (ACP) des souris CONT et HF.....	118
Figure 41: ACP : Représentation des variables sur les deux premiers axes propres de l'ACP.....	118
Figure 42 : Représentation des souris high fat sur les deux premiers axes propres de l'ACP.	120
Figure 43 : ACP : Représentation des variables sur les deux premiers axes propres de l'ACP.....	120
Figure 44 : Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique sur composantes principales des souris high fat.....	120
Figure 45 : Comparaison du gain de poids, de la consommation et de l'efficacité alimentaire, du poids des organes, de la glycémie à jeun et de l'intolérance au glucose des souris contrôles, répondeuses et non répondeuses.....	122
Figure 46 : Coupes histologiques du tissu inguinal.	123
Figure 47 : Coupe histologique du foie.....	124
Figure 48 : Coupes histologies de l'iléon..	125
Figure 49 : Dosages plasmatiques de 3 hormones et de 3 cytokines par la technologie luminex et évaluation de l'insulinorésistance des souris par calcul de l'indice HOMA-IR.	127
Figure 50 : ACP de l'expression des gènes hépatiques des souris NR et R..	129
Figure 51 : Quantité relative de l'expression des gènes hépatiques.....	129
Figure 52 : ACP de l'expression des gènes de l'iléon des souris NR et R.....	131
Figure 53 : Quantité relative de l'expression de gènes dans l'iléon impliqués dans la perméabilité intestinale, le transport de lipides et de glucose, les récepteurs de lipides, le métabolisme oxydatif des lipides, l'absorption du glucose, la sensation de satiété et l'inflammation.....	131
Figure 54 : Analyse en composantes principales de l'expression des gènes du tissu adipeux inguinal des souris NR et R.....	134
Figure 55 : Quantité relative de l'expression de gènes dans le tissu adipeux inguinal.....	134
Figure 56 : Analyse en composante principale de l'expression des gènes du muscle gastrocnémien des souris NR et R.....	136
Figure 57 : Quantité relative de l'expression de gènes dans le muscle gastrocnémien.....	136
Figure 58 : Quantité (μmol) d'acides gras à chaînes courtes au niveau du caecum..	138
Figure 59 : Contenu caecal des 3 groupes de souris.	138

Figure 60 : Concentration ($\mu\text{mol/g}$) caecale des AGCC. n=10 pour les CONT.....	139
Figure 61 : Dosage plasmatique des tryglycérides, des acides gras libres et du cholestérol.....	140
Figure 62 : Dosage du LPS plasmatique.....	141
Figure 63 : a. FISH-FCM.	143
Figure 64 : Comptage des gènes des souris répondeuses et non répondeuses.....	145
Figure 65 : Clusterisation Ascendante Hiérarchique des 28 échantillons (Corrélation de Spearman et méthode de Ward) sur la base du catalogue de 2,6 millions de gènes.	146
Figure 66 : Clusterisation Ascendante Hiérarchique des 28 échantillon analysés (Corrélation de Spearman et méthode de Ward) sur la base des MGS..	148
Figure 67 : Représentation graphique des fonctions contrastées entre souris répondeuses et souris non répondeuses une semaine avant le régime hyperlipidique.....	151
Figure 68 : Analyse taxonomique du microbiote intestinal des souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique.....	152
Figure 69 : Abondance des gènes du genre <i>Eubacterium</i> et <i>Lachnoclostridium</i> dans les 28 échantillons	153
Figure 70 : Analyse taxonomique du microbiote intestinal des 28 échantillons analysés au niveau des phylas et des genres.....	154
Figure 71 : Impacte du régime hyperlipidique sur la taxonomie des genres bactériens du microbiote intestinal.....	156
Figure 72 : Impact du régime hyperlipidique sur la taxonomie des genres bactériens du microbiote intestinal.....	157
Figure 73 : 29 méta-espèces contrastés entre les souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique.....	160
Figure 74 : Analyse discriminante du métabolome fécal.....	161
Figure 75 : Analyse discriminante du métabolome urinaire.	162
Figure 76 : Analyse discriminante du métabolome plasmatique (ionisation négative).....	163
Figure 77 : Analyse discriminante du métabolome plasmatique (ionisation positivée).	164
Figure 78 : Super modèle d'analyse discriminante.	165

Table des tableaux

Tableau 1 : Techniques utilisées pour caractériser le microbiote intestinal.	70
Tableau 2 : Les différentes analyses méta-omiques.	71
Tableau 3 : Composition lipidique des différents régimes.....	76
Tableau 4 : Liste des gènes analysés pour leur expression au sein des quatre tissus étudiés.....	82
Tableau 5 : Liste des sondes utilisées pour l'analyse de FISH.....	85
Tableau 6 : Annotation taxonomique des MGS.....	96
Tableau 7 : Tableau de synthèse des analyses des fonctions différentiellement représentés entre répondeurs et non répondeurs avant régime hyperlipidique..	98
Tableau 8 : Composition des solvants et paramètres utilisés en HPLC inverse.	108
Tableau 9 : Représentation du gradient eau-acétonitrile utilisé en HPLC inverse en fonction du temps..	108
Tableau 10 : Paramètres du Q-Extractive.	109
Tableau 11 : Comparaison des abondances de gènes entre les quatre groupes de souris.....	149
Tableau 12 : Comparaison des clusters de fonctions des souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique.....	150
Tableau 13 : Synthèse des analyses statistiques sur les phyla, les ordres, les familles et les genres.	158
Tableau 14 : Tableau des MGS contrastés entre les 4 groupes.....	159

Liste des abréviations

ACC	Acetyl-CoA carboxylase
ACO	Aconitase
ACP	Analyse en composante principale
AGCC	Acides Gras à Chaîne Courte (ou SCFA pour short chain fatty acids)
AMPK	5' Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
Angptl4	Angiopoietin-Like Protein 4
BMI	Body Mass Index
CAG	Cluster of Abondant genes
CAH	Classifiacation Ascendante Hierarchique
CD36	Cluster of Differentiation 36
ChREBP	Carbohydrate Responsive Element Binding Protein
COG	Clusters of Orthologous Groups
CONT	Contrôle
CPT1	Carnitine Palmitoyltransferase I (CPT1)
CY5	Cyanine 5
DGGE	Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
FABP	Fatty Acid Binding Protein
FAS	Fatty Acid Synthase
FATP	Fatty Acid Transport Protein
FIAF	Fasting Induced Adipose Factor
FITC	Fluorescein Isothiocyanate FIZZ3
GC/MS	Gas Chromatography–Mass Spectrometry
GLP-1	Glucagon Like Peptide 1
GLP-2	Glucagon Like Peptide 2
GLUT-4	Transporteur de Glucose 4
Gpr	protéine G
HDL	High Density Lipoprotein
HF	High Fat
HFD	High Fat Diet
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment - Insulin-Resistance
IFN	Interféron
IL	Interleukine
IMC	Indice de masse corporelle
IRS	Insulin receptor substrate
IRS	Insulin receptor substrate

KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LC/MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
Lpl	Lipoprotein lipase
LPS	Lipopolysaccharides
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
MGS	MetaGenomic Species
MS ESI TOF	Mass Spectrometry Electrospray Ionisation Time Of Flight
NAFLD	Non Alcoholic Fatty Liver Disease
NDUFA11	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11
NF-κB	Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NR	Non Répondeur
NRF	Nuclear respiratory factor 1
OGTT	Oral Glucose Tolerance Test
PBS	phosphate buffered saline
PDK4	Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4
PGC-1	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1
PPAR	peroxisome proliferator activated receptor
PYY	Peptide yy
R	Répondeur
SREBP-1c	sterol regulatory element binding protein 1c
TFAM	Mitochondrial transcription factor A
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor
TTGE	Temporal Temperature Gel Electrophoresis
UCP3	Mitochondrial uncoupling protein 3
VLDL	very low-density lipoprotein

1. L'obésité : Etat des lieux

1.1. L'obésité à travers le monde

Chaque minute dans le monde environ 5 personnes meurent des conséquences de leur obésité. Cette pathologie multifactorielle cause ainsi le décès de 2.8 millions de personnes par an et constitue la cinquième cause de décès mondiale (Ng et al. 2014) (Figure 1). Selon les estimations faites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la prévalence du surpoids et de l'obésité a plus que doublé entre 1980 et 2014 et concerne aujourd'hui 1,9 milliard de personnes de 20 ans et plus, parmi lesquelles plus de 200 millions d'hommes et près de 300 millions de femmes sont obèses (soit 13% de la population mondiale). Les enfants ne sont pas épargnés puisque plus de 42 millions d'enfants de moins de cinq ans étaient en surpoids en 2014¹.

Problème de santé autrefois réservé aux pays à revenu élevé, l'obésité existe aussi désormais dans les pays à revenu faible ou intermédiaire où 115 millions de personnes sont touchées par l'obésité. Ainsi, selon un rapport de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) de 2013, le Mexique et l'Egypte ont dépassé les Etats-Unis en proportions d'obèses avec, respectivement, 32.8% et 34.6% de la population atteinte contre 31.8% pour les Etats-Unis². Si la tendance actuelle se confirme, d'ici 2017 environ 2,3 milliards d'adultes seront en surpoids et plus de 700 millions seront obèses. Et d'ici 2030, 47% de la population mondiale sera en surpoids (Finkelstein et al., 2015). Selon un rapport de l'OCDE³ de 2011 analysant la prévalence de l'obésité, la France se place au 12^{ème} rang sur les 40 pays étudiés, et au 7^{ème} rang européen.

1.2. L'obésité en France

En France, la société Roche en collaboration avec l'Inserm, l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière et le cabinet de conseil Kantar Health procède tous les 3 ans à une enquête épidémiologique nationale sur la prévalence du surpoids et de l'obésité (ObEpi). La dernière enquête, réalisée entre janvier et mars 2012 sur 25 000 foyers, montre que 32,3% des Français adultes de 18 ans et plus sont en surpoids (14 millions de personnes) et 15% (6,9 millions) présentent une obésité. La prévalence de l'obésité est ainsi passée de 8,5% à 15% entre 1997 et 2012 tandis que le pourcentage de Français sans surpoids est passé de 62% en 1997 à 53% en 2012. La prévalence de la forme d'obésité la plus sévère est passée de 0,3% de la population en 1997 à 1,2% en 2012.

¹ Aide mémoire OMS n°311 (Mars 2013) : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/fr/>

² Rapport de la FAO 2013 sur la situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture : <http://www.fao.org/docrep/018/i3301f/i3301f.pdf>

³ Organisation de Coopération et de Développement Economique : Cette organisation rassemble 34 pays et son rôle, est de comparer les expériences politiques internationales dans différents domaines (économie, innovation, et durabilité entres autres) et de coordonner les politiques nationales et internationales de ses pays membres.

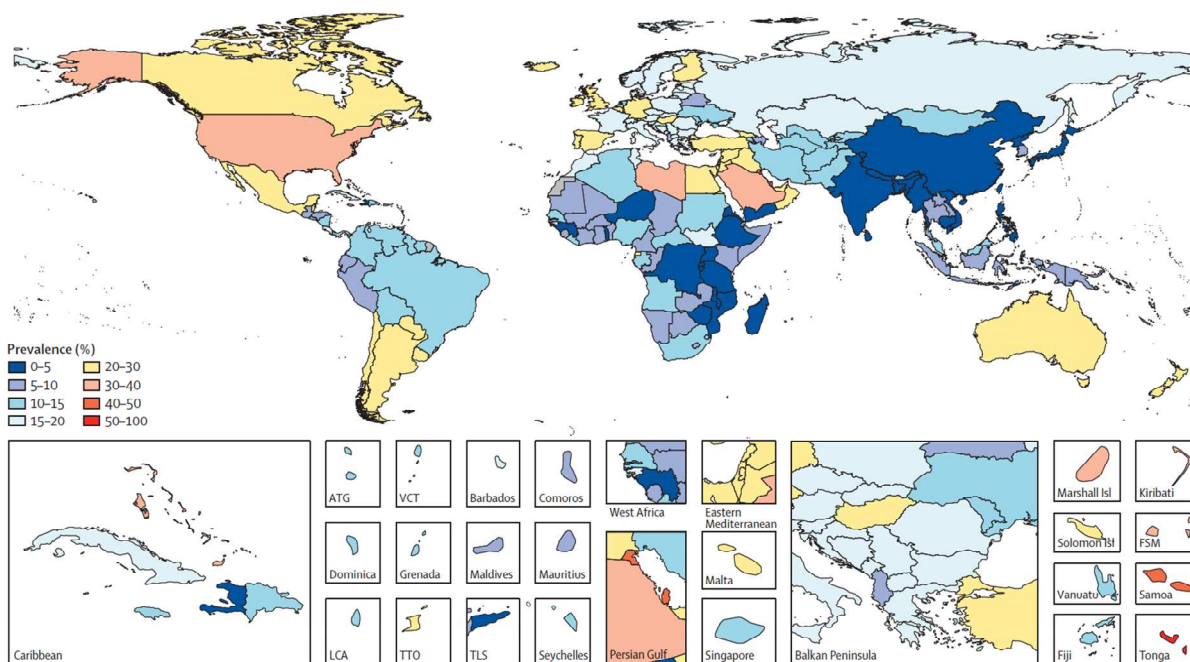
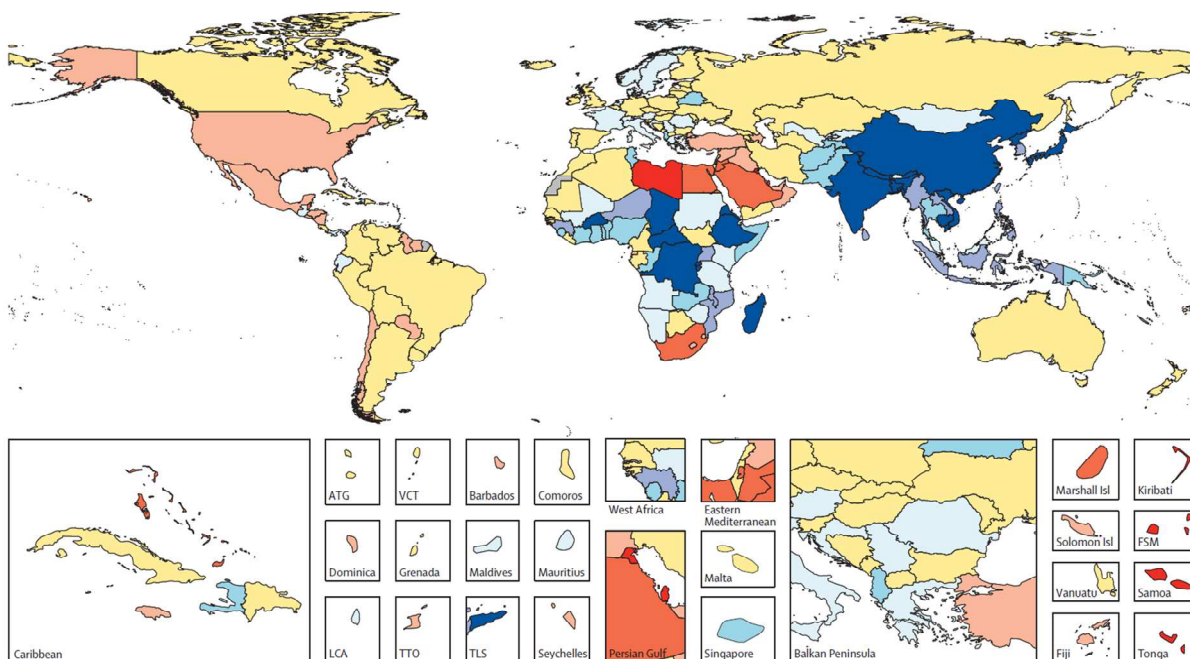
A. Prévalence de l'obésité masculine , IMC \geq 30 kg, âge \geq 20 ans**B. Prévalence de l'obésité Féminine, IMC \geq 30 kg, âge \geq 20 ans**

Figure 1 : Prévalence de l'obésité mondiale en 2013. A. Obésité masculine. B. Obésité féminine. VCT=Saint Vincent et les Grenadines. FSM=États fédérés de Micronésie. LCA=Sainte Lucie. TTO=Trinité et Tobago. TLS=Timor oriental. (D'après Ng et al., 2014).

L'augmentation de la prévalence de l'obésité se poursuit donc dans notre pays mais avec une tendance significative à la décélération. En effet, l'augmentation estimée entre 2009 et 2012 n'est que de 0,5 %, alors qu'elle avait toujours dépassé 1 % sur la période de 3 ans séparant deux études ObEpi jusqu'à présent. Il faut cependant bien souligner que la tendance évolutive de la prévalence de l'obésité est évaluée à partir d'une suite d'estimations successives par les différentes études ObEpi. Il reste possible que des biais d'échantillonnage, de réponse voire même le hasard amène à conclure de façon erronée à un ralentissement de la progression de la prévalence de l'obésité.

1.3. Coût de l'obésité

Au-delà des conséquences sur la santé des individus, l'obésité a un impact non-négligeable sur l'économie de la santé pour les pays concernés. Une méta-analyse de 32 études réalisées entre 1990 et 2009 a comparé les estimations des coûts directs correspondants aux dépenses de santé liées au surpoids et à l'obésité dans plusieurs pays à revenu élevé ainsi qu'au Brésil et en Chine. Pour les adultes, ces estimations allaient de 0,7% à 9,1% des sommes totales consacrées à la santé par ces différents pays (Withrow et al., 2011). Ces dépenses atteignant même 10% aux Etats-Unis (Finkelstein et al., 2009). En France, les dépenses de santé liées à l'obésité atteignent 2,6 milliards d'euros et du point de vue de l'assurance maladie, les montants remboursés liés à l'obésité sont de 2,1 milliards d'euros (Emery et al. 2007). Entre 1992 et 2002, le pourcentage des dépenses de santé consacrées à l'obésité est passé d'une fraction comprise entre 0,7 et 2% à une proportion estimée entre 1,5 et 4,6%. Par ailleurs, l'obésité coûte 2000 milliards de dollars à l'économie mondiale et se place en 3^{ème} position juste derrière le coût des décès associés au tabac et aux morts violentes (guerre, armes à feu) (Spatharou 2014).

1.4. Les pathologies associées à l'obésité

Aux alentours de 400 avant notre ère Hippocrate affirmait : « la corpulence n'est pas seulement une maladie en soi, mais le signe avant-coureur d'autres affections ». Quatre siècles avant Jésus-Christ, l'obésité était déjà reconnue comme un désordre médical pouvant s'accompagner de nombreuses comorbidités. Ainsi, les conséquences de l'obésité et de la surcharge pondérale sur la santé sont multiples, allant de troubles non fatals mais ayant des effets néfastes sur la qualité de vie à une augmentation de la mortalité précoce.

Pour bien comprendre ce que l'on nomme obésité, il est important d'en avoir une définition claire et universelle. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit le surpoids et l'obésité comme « un excès anormal de masse adipeuse ayant des effets néfastes sur la santé ». Cependant, il faut distinguer le surpoids de l'obésité réelle. C'est pourquoi, face à l'émergence du nombre de personnes en surpoids et obèses dans les pays développés et en voie de développement, il a été nécessaire de mettre en place un système de classification de ces patients. Dans les années 90, l'OMS décida de se baser sur l'indice de masse corporelle (IMC), créé par Adolphe Quetelet au milieu du XIX^{ème} siècle, qui se calcule de la manière suivante :

$$IMC = \frac{\text{Poids (kg)}}{\text{Taille}^2 \text{ (m)}}$$

Depuis, cet indice sert de mesure universelle dans l'évaluation du surpoids et de l'obésité. Il permet de définir la charge pondérale des patients comme insuffisante ($IMC < 18,5 \text{ kg.m}^{-2}$), normale ($18,5 \text{ kg.m}^{-2} < IMC < 25 \text{ kg.m}^{-2}$), en surcharge ($IMC > 25 \text{ kg.m}^{-2}$), ou excédentaire ($IMC > 30 \text{ kg.m}^{-2}$) et d'y associer un risque d'apparition de morbidités⁴. L'obésité se définit donc par un $IMC > 30 \text{ kg.m}^{-2}$. On note également que les individus avec un IMC égal ou supérieur à 30 kg.m^{-2} ont plus de 50% de risque de mourir prématurément en comparaison avec des individus ayant un IMC compris entre 20 et 25 kg.m^{-2} (F. Xavier Pi-Sunyer 1998).

De plus, l'état d'obésité est aujourd'hui associé à l'apparition de diverses pathologies (Figure 2). Il est clairement établi aujourd'hui que le risque de développer un diabète de type II (diabète non insulino-dépendant) augmente avec l'IMC et diminue avec la perte de poids (Logue & Sattar 2013). On estime à l'heure actuelle que 75% des patients diabétiques de type II sont obèses et que pour une valeur d'IMC supérieure ou égale à 30, le risque de diabète de type II est multiplié par dix chez la femme et par huit chez l'homme.

Un profil hormonal altéré est également observé chez les patients obèses et de manière générale, la résistance à l'insuline est très souvent associée à l'obésité (Saltiel et al., 2001). Elle est même systématiquement retrouvée chez les patients présentant un $IMC > 40$, ce qui a fait suggérer à certains scientifiques que la résistance à l'insuline serait un mécanisme d'adaptation à l'obésité afin de limiter le développement du tissu adipeux (Eckel 1992).

Les individus obèses présentent fréquemment un état dyslipidémique dans lequel les taux de triglycérides plasmatiques et de lipoprotéines de basse densité (LDL, *Low Density Protein*), communément appelées le « mauvais cholestérol » sont élevés et les taux de lipoprotéines de haute densité (HDL, *High density lipoprotein*), ou le « bon cholestérol » sont bas. De nombreuses autres perturbations métaboliques sont rencontrées lors de l'obésité et ont été regroupées sous le nom de « syndrome métabolique ». La définition clinique du syndrome métabolique repose sur cinq paramètres, mais la présence de trois suffit à poser le diagnostic :

1. Une obésité centrale : tour de taille $> 102 \text{ cm}$ chez les hommes et $> 88 \text{ cm}$ chez les femmes
2. Un faible taux de cholestérol de type HDL: $HDL < 40 \text{ mg/dl}$ chez les hommes et $< 50 \text{ mg/dl}$ chez les femmes
3. Une hypertriglycéridémie : triglycérides $> 150 \text{ mg/dl}$
4. Une élévation de la pression sanguine : tension artérielle $> 130/85 \text{ mm Hg}$
5. Une diminution de la tolérance au glucose ou une résistance à l'insuline

D'autres complications surviennent avec le développement de l'obésité (Figure 2) telles que la stéatose hépatique non-alcoolique (Yki-Järvinen 2014), l'hypertension et les troubles cardiovasculaires (Mathieu et al., 2010), les atteintes respiratoires (Ryan et al., 2014), et les complications ostéo-articulaires (Anandacoomarasamy et al., 2007). Enfin l'obésité est également associée à un risque plus élevé de développer certains cancers (Louie et al., 2013).

⁴ Présence d'un ou de plusieurs troubles associés à une maladie dite « primaire ».

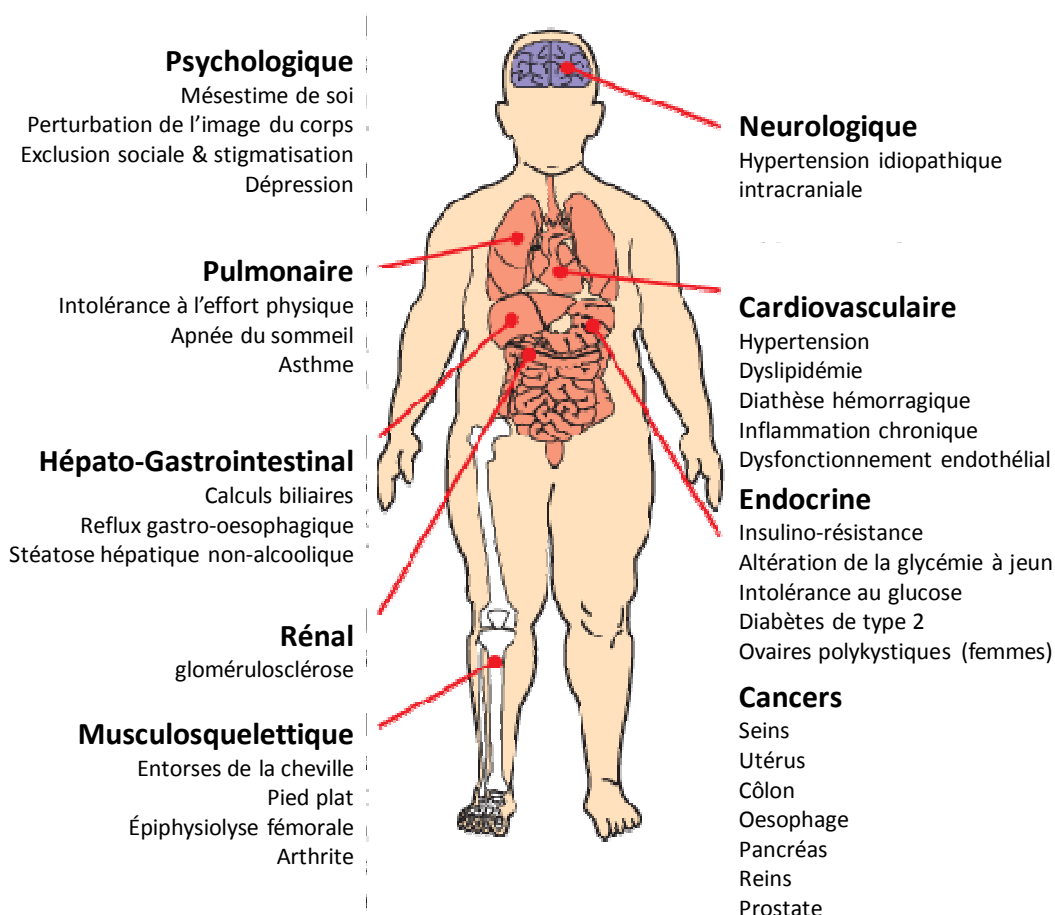


Figure 2 : Facteurs de risque, complications et pathologies associés à l'obésité. Les troubles associés à l'obésité peuvent toucher l'ensemble de l'organisme et avoir de plus une dimension psychologique.

1.5. Obésité et balance énergétique

La régulation du poids corporel repose sur une équation simple dont les apports et les dépenses en énergie sont les deux membres : c'est la balance énergétique (Figure 3). L'inadéquation des apports caloriques aux besoins énergétique totaux de l'individu est une cause incontournable de l'obésité : tout excès calorique induit une prise de poids s'il est prolongé. De même que la réduction du niveau d'activité physique augmente la vulnérabilité des sujets face au risque d'obésité et peut conduire à une prise de poids si elle est associée à l'absence d'adaptation des apports alimentaires. Par ailleurs, le gain de poids est un processus évolutif qui, chez l'homme, peut se dérouler sur plusieurs années et le déséquilibre énergétique n'a pas besoin d'être important pour conduire à l'obésité s'il est chronique.

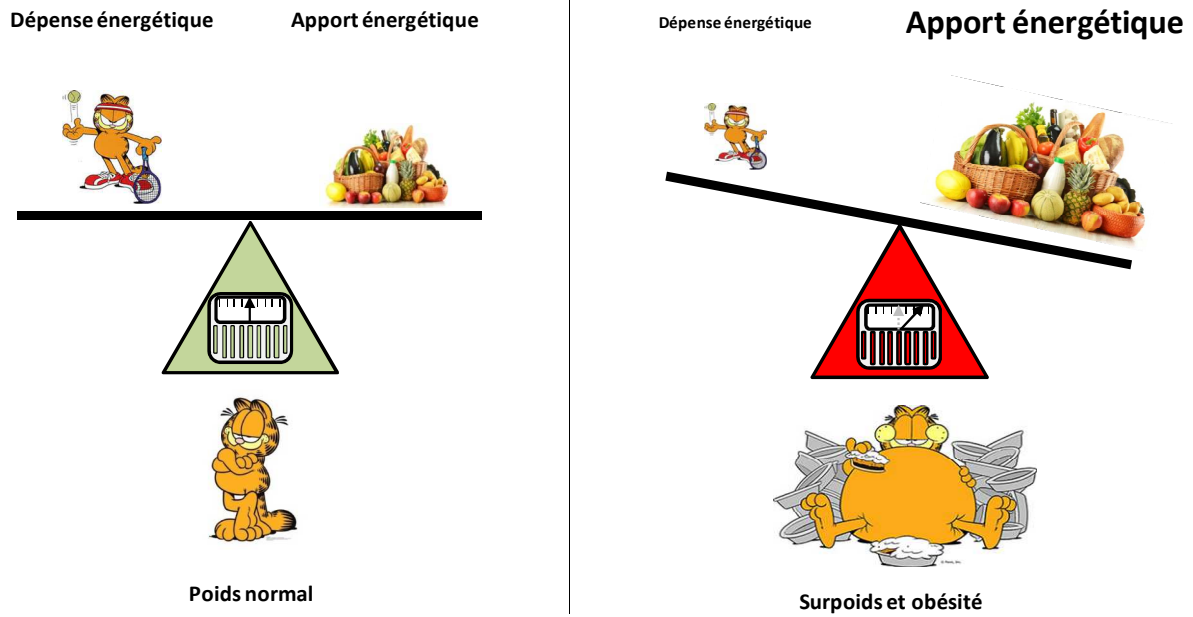


Figure 3 : L'homéostasie énergétique dépend de la balance entre l'apport calorique et la dépense énergétique. L'apport calorique est presque exclusivement dû à la consommation alimentaire tandis que la dépense énergétique à plusieurs composantes tel que le métabolisme basal, l'activité physique et la thermogénèse.

2. Les modèles d'obésité

2.1. Les modèles génétiques

L'utilisation du modèle animal en laboratoire combiné à l'approche « gène candidat » a permis de mieux comprendre les bases génétiques de l'obésité en permettant des expérimentations qui se révèlent techniquement ou éthiquement impossibles chez l'Homme (Speakman et al., 2008). Lors de la découverte du gène de la leptine dans les années 1990, l'hypothèse d'une origine génétique de l'obésité a ainsi été largement développée. Une mutation sur le gène de la leptine ou sur celui de son récepteur provoque en effet chez les souris porteuses de ces mutations une obésité constitutive. Mais il est apparu que chez l'Homme, ces mutations ne seraient responsable que de moins de 5% des cas d'obésités sévères (Farooqi et al., 2006).

Par la suite, des études menées sur le modèle souris ou sur le modèle rat ont permis d'étudier les fonctions de gènes impliqués dans les formes monogéniques de l'obésité tels que le gène *FTO*⁵ (Fat mass and Obesity-associated gene) (Stratigopoulos et al., 2008), le gène *POMC*⁶ (pro-opiomélanocortine) (Pritchard et al. 2002), ou encore le gène codant pour le récepteur à la leptine (*LEPR*) (Gilbert et al. 2003).

Cependant, le rôle de l'environnement dans le développement de l'obésité et dans l'augmentation de sa prévalence actuelle ne fait pas de doute. Au cours des dernières décennies, dans les populations occidentalisées, un accroissement de l'apport calorique a été enregistré et demeure, concomitamment à la réduction de l'activité physique, un facteur important impliqué dans le développement de l'obésité (cf. §1.5) (Bleich et al. 2008). Il est donc important d'avoir des approches plus réalistes afin d'étudier le développement de cette pathologie et notamment des modèles tenant compte des facteurs de l'environnement tel que le régime alimentaire. En effet, les régimes à haute valeur énergétique, contenant un fort taux de graisses et/ou de sucres, associés à des modes de vie sédentaires sont fortement soupçonnés d'être des facteurs de l'environnement contribuant de manière significative à l'épidémie d'obésité à travers le monde (McArdle et al. 2013). Par conséquent, l'utilisation de régimes enrichis en lipides dit « hyperlipidiques » combinée aux modèles animaux permettent de développer des approches qui s'apparentent au plus près aux situations observées chez l'humain.

⁵ Ce gène code une dioxygénase principalement exprimée dans l'hypothalamus. Sa (ou ses) fonction(s) n'est pas clairement identifiée à l'heure actuelle mais on sait que cette enzyme intervient dans la régulation de la prise alimentaire et la sensation de satiété.

⁶ Neuropeptide anorexigène produit dans l'hypothalamus dont l'expression est stimulé par la leptine.

2.2. Régimes riches en lipides et obésité induite

Dans les années 1950, Paul Frederic Fenton observe qu'en fournissant une alimentation de type hyperlipidique contenant des proportions croissantes de lipides, à différentes souches de souris, certaines souches affichent un gain de poids plus marqué que d'autres. Les souches les plus répondeuses au régime accumulent leurs excès de poids sous forme de graisse (Fenton et al. 1951). En 1955, Olaf Mickelsen montre pour la première fois chez le rat que le développement de l'obésité implique un excès d'absorption de calories, mettant ainsi en avant la notion de balance énergétique (Mickelsen et al. 1955).

L'utilisation des régimes riches en lipides ou hyperlipidiques chez les rongeurs est aujourd'hui reconnue comme un bon modèle des troubles de l'obésité humaine (Buettner et al. 2007). Les lipides contenus dans le régime alimentaire sont des déterminants majeurs de la prise de poids ainsi que des réponses tissues spécifiques (Hageman et al. 2010), bien que certains travaux aient montré qu'au sein d'une même cohorte d'individus et pour une souche donnée, tous les animaux ne répondent pas de la même manière au régime hyperlipidique (Montgomery et al. 2013).

2.2.1. Les différents types de régimes hyperlipidique

La définition du terme « régime hyperlipidique » peut être sujet à discussion puisque la composition des graisses ainsi que leurs proportions ne sont pas standardisées et varient d'un régime à l'autre. De plus, la structure des acides gras alimentaires, la longueur de leurs chaînes carbonées, leurs degrés de saturation ou bien la position de leurs doubles liaisons affectent leurs destinées métaboliques (Madsen et al. 2005) et par conséquent leur influence sur le développement de l'obésité.

Beaucoup de régimes hyperlipidiques utilisés en expérimentation animale contiennent une majorité de lipides saturés (SFA⁷) tels que la graisse de bœuf, le lard ou l'huile de noix de coco. Certains régimes utilisent l'huile d'olive qui est riche en acides gras mono insaturés (MUFA⁸) ou bien l'huile de maïs qui est riche en $\omega 6$ (PUFA⁹) et l'huile de poisson qui est riche en $\omega 3$ (PUFA) (Buettner et al. 2007). Une étude publiée par Nadiah Moussavi et coll. sur les associations entre la composition en acides gras des régimes et le changement de poids montre que les régimes riches en SFA semblent favoriser une plus grande prise de poids chez la souris (Moussavi et al. 2008) que les régimes riches en PUFA.

Cependant, certains régimes à base d'huile de poisson (PUFA riche en $\omega 3$), restent sujets à discussion sur une éventuelle perte de poids. Certaines études menées chez l'homme vont dans ce sens (Kelly et al. 2015; Lorente-Cebrián et al. 2013), tandis que d'autres n'observent pas de changement de poids après consommation d'un tel régime (Munro et al. 2012). Il est toutefois établi qu'une alimentation riche en huile de poisson a des effets bénéfiques sur la résistance à

⁷ Saturated Fatty acid

⁸ Monounsaturated fat

⁹ Polyunsaturated fat

l'insuline hépatique, diminue la lipogenèse et favorise la β -oxydation (Bargut et al. 2014). D'une manière générale les régimes PUFAs riches en $\omega 3$ améliorent l'état inflammatoire associé à l'obésité (syndrome métabolique) (Teng et al. 2014), tandis que les régimes PUFAs riches en $\omega 6$ augmentent la masse grasse chez les rongeurs (Muhlhausler & Ailhaud 2013).

Les différentes proportions de lipides contenues dans ces régimes ont également fait l'objet d'études. Ces différences se traduisent par le fait que plus la quantité de gras contenue dans le régime est élevée, plus le développement de l'obésité est important et précoce (Boozar et al. 1995; Ghibaudi et al. 2002). Il semble aussi exister un effet seuil relatif à la proportion de lipides (25%) à partir de laquelle le développement de l'obésité est inévitable (Bray et al. 2004). Ceci explique pourquoi les régimes hyperlipidiques utilisés en expérimentation contiennent généralement de 30 à 60% de l'énergie provenant des lipides. Les régimes contenant 60% de lipides sont couramment utilisés afin d'induire une obésité chez les rongeurs car les animaux ont alors tendance à prendre plus de poids plus rapidement (Ghibaudi et al. 2002).

Enfin, suivant la teneur en lipides et/ou en sucre, on distingue globalement trois types de régimes, les régimes dit pauvres en lipides ou « low fat » contenant une faible proportion de lipides, les régimes hyperlipidiques comprenant les régimes hyperlipidiques standard ayant une forte proportion de lipides et une proportion « normale » de glucides et de protéines, et enfin les régimes western contenant une forte proportion de lipides et de glucides et une proportion moindre de protéines.

Au cours de ce projet de thèse nous avons utilisés un régime hyperlipidique standard comprenant 60% kcal apportées par les lipides, 20% kcal par les glucides et 20% kcal par les protéines.

2.2.2. Les effets du régime hyperlipidique sur le développement de l'obésité.

Comme nous venons de le voir la différence de composition des régimes hyperlipidiques est un facteur important dans le développement d'une obésité induite. Par ailleurs, il a été montré que la souche de l'animal utilisée avait également son importance. Les souris C57BL/6, AKR/J et DBA/2J sont reconnues comme étant plus sujettes au développement de l'obésité et de l'insulinorésistance que les souches SWR/J, A/J et 129S/6 (Alexander et al. 2006). Les souris résistantes à l'obésité induite par un régime accumulent du tissu adipeux uniquement sous un régime high-fat contenant une faible teneur en protéine (West et al. 1992). A l'inverse les souches sujettes à l'obésité induite par un régime deviennent obèses quels que soient les régimes hyperlipidiques. La souche C57BL/6, utilisée au cours de ce projet, a ainsi souvent été employée pour l'étude du syndrome métabolique et de l'insulinorésistance (Collins et al. 2004; Andrikopoulos et al. 2005).

La haute teneur en matières grasses dans l'alimentation des rongeurs induit des changements au niveau de la prise de poids et de la prise alimentaire similaires à ceux rencontrés chez les êtres humains. La prise de poids et l'obésité qui découlent de la consommation d'un régime hyperlipidique sont les effets les plus facilement remarquables. Bien que la prise de poids soit effective dès 2 semaines de régime, celle-ci devient plus manifeste après 4 semaines de

régime (Buettner et al. 2007). D'autre part, les régimes hyperlipidiques favorisent une prise alimentaire excessive et sont moins satiétogènes que les régimes sucrés ou protéiques (Kozimor et al. 2013) et la balance énergétique de l'individu s'en trouve donc perturbée. Les effets du régime hyperlipidiques sur le développement de l'obésité se répercutent également sur différents organes tels que le tissu adipeux, les intestins, le foie ou encore les muscles squelettiques.

2.3. Les effets physiologiques du régime hyperlipidique

2.3.1. Le tissu adipeux

Le tissu adipeux¹⁰ exerce une double fonction qui le place au cœur de l'homéostasie énergétique chez les mammifères. D'une part, c'est le seul tissu capable de stocker les réserves de l'organisme sous forme de triglycérides dans des cellules hautement spécialisées : les adipocytes. Il assure également la libération des lipides dans la circulation en cas de besoin de l'organisme lors de la lipolyse. D'autre part, il est capable d'intégrer des signaux hormonaux venant de différentes parties de l'organisme et d'y répondre en sécrétant ses propres peptides de signalisation : les adipokines. Ces médiateurs ont un impact sur de nombreux tissus cibles comme le foie ou les muscles squelettiques et participent directement au contrôle général de la balance énergétique et du métabolisme glucido-lipidique (Khan & Joseph 2014; Ronti et al. 2006). Certaines de ses adipokines comme la leptine ou l'adiponectine activent des circuits neuronaux dans l'hypothalamus ou d'autres régions cérébrales avec un impact sur la régulation systémique de la dépense énergétique et le catabolisme lipidique (Khan & Joseph 2014). En plus de la production de ces adipokines, le tissu adipeux, en condition de stress, sécrète aussi des cytokines pro- ou anti- inflammatoires ayant des actions autocrines et/ou paracrines qui contribuent également au contrôle de l'homéostasie énergétique. La production de molécules biologiquement actives place donc le tissu adipeux au cœur d'un réseau complexe d'interactions entre organes, indispensable à l'homéostasie de l'organisme.

La production et la sécrétion de ces cytokines par le tissu adipeux sont régulées par la masse adipeuse et le statut physiologique de l'organisme. Ainsi, une alimentation basée sur la consommation d'un régime hyperlipidique induit une prise de poids essentiellement basée sur une accumulation de graisse dans le tissu adipeux. Au cours du développement de l'obésité, le tissu adipeux est la cible d'un remaniement cellulaire et structural : le régime hyperlipidique entraîne une hypertrophie (augmentation de la taille) et une hyperplasie (augmentation du nombre) des adipocytes (Sun et al. 2011) qui participent à la modification de l'homéostasie de l'individu.

¹⁰ Il existe deux types de tissus adipeux : le tissu adipeux blanc et le tissu adipeux brun. Nous faisons référence ici au tissu adipeux blanc.

2.3.1.a. La lipogenèse

Il existe deux sources d'acides gras dans le métabolisme animal : les acides gras exogènes apportés par l'alimentation et les acides gras synthétisés de manière endogène. La biosynthèse des acides gras endogènes (ou lipogenèse) dépend de différents processus enzymatiques. La synthèse des acides gras est d'une importance cruciale dans la physiologie cellulaire en général et dans la physiologie du tissu adipeux en particulier (Proenca et al. 2014). La Fatty acid synthase (FAS) et l'acétyl-CoA-carboxylase (ACC) constituent les enzymes clés de la synthèse des lipides associée au développement de l'obésité chez l'homme (Berndt et al. 2007; M Lenhard 2011). FAS est une enzyme centrale dans la lipogenèse *de novo* et catalyse la conversion du manoyl-CoA en palmitate. L'ACC quant à elle catalyse la formation du manoyl-CoA, un substrat essentiel de FAS et du système d'élongation des chaînes d'acides gras. Chez l'homme, le tissu adipeux viscéral d'individus obèses présente une plus forte expression des gènes FAS (Blüher et al. 2013), bien que certaines études observent une diminution de l'expression de FAS et de ACC (Letexier et al. 2003; Ortega et al. 2009).

2.3.1.b. Les adipokines

i. La leptine

La leptine a été la première adipokine découverte (Zhang et al. 1994). Elle agit à distance au niveau du système nerveux central (hypothalamus) en contrôlant la sensation de satiété (hormone anorexigène) (Satoh et al. 1998; Blüher & Mantzoros 2015). D'autre part, la leptine régule la dépense énergétique en induisant la lipolyse (β -oxydation) et en inhibant la lipogenèse (et donc l'accumulation de lipides) au niveau des tissus périphériques d'une part (Moran & Phillip 2003), et en augmentant la sensibilité à l'insuline et le captage du glucose d'autre part (Yadav et al. 2013). Cependant, chez les sujets obèses, le taux de leptine circulant plus élevé que la normale est associé à une leptino-résistance du système nerveux central (Sáinz et al. 2015). De même, chez des souris sous régime hyperlipidique, le taux de leptine est élevé et positivement corrélé avec la prise de poids (Lin et al. 2000).

ii. L'adiponectine

Découverte à peu près en même temps que la leptine, l'adiponectine se distingue des autres adipokines par le fait que ses concentrations circulantes sont diminuées chez le sujet obèse (Ghoshal & Bhattacharyya 2014) ainsi que chez la souris soumise à un régime hyperlipidique (Kwon et al. 2012). Ainsi, des souris C57BL/6J sous régime hyperlipidique pendant 4 mois ont une diminution cumulée significative de l'expression génique et de la production d'adiponectine (Barnea et al. 2006). Comme la leptine, l'adiponectine active les voies lipolytiques dans les tissus périphériques comme le muscle et favorise l'effet stimulateur de l'insuline sur l'utilisation périphérique du glucose. Le foie est également l'un de ses tissus cibles dans lequel elle provoque une diminution de la production de glucose (effet inverse de celui de la résistine).

iii. La résistine

La résistine est un polypeptide exprimé et sécrété essentiellement par le tissu adipeux chez la souris (Ye et al. 2013). Elle peut être produite en quantités plus modestes par de nombreux autres organes tels que le cerveau (Rodriguez-Pacheco et al. 2013), le muscle squelettique (Nogueiras et al. 2003), et le pancréas (Xue et al. 2015). La résistine semble jouer le rôle de senseur de l'état nutritionnel global étant donné que son expression augmente après la prise alimentaire et diminue durant le jeûne (Park & Ahima 2013). La résistine doit son nom à son effet tissulaire : l'insulinorésistance induite par sa fixation sur les récepteurs à l'insuline des adipocytes, du foie et des muscles. Des souris KO pour le gène de la résistine et nourries avec un régime hyperlipidique ont un métabolisme glucidique amélioré comparativement au souris non KO (Banerjee et al. 2004). D'autre part des études ont montré que l'expression de la résistine était augmentée notamment dans le tissu adipeux d'animaux obèses et diminuait en présence de thiazolidinediones (antidiabétiques) (Rajala et al. 2004). La résistine limite donc l'action de l'insuline au niveau des adipocytes (Steppan et al. 2001), ce qui a pour conséquence une diminution de l'absorption de glucose. La résistine est donc une adipokine essentielle dans le développement du diabète de type 2 chez la souris.

Chez l'homme, le sujet est encore débattu. La résistine est produite par les macrophages infiltrés dans le tissu adipeux (Schwartz & Lazar 2011). Certaines études ont démontré une corrélation positive entre la quantité de résistine circulante et l'obésité ou l'insulinorésistance (Gharibeh et al. 2010) tandis que d'autres n'ont pas mis en évidence une telle corrélation (Lee et al. 2003; Iqbal et al. 2005). Plusieurs pistes ont été évoquées pour expliquer de telles différences. Les variations sériques de résistine ont été attribuées à des causes génétiques (Qi et al. 2012) ou à l'âge (Gerber et al. 2005). Il est cependant intéressant de noter que la résistine humaine exprimée dans des macrophages de souris induit une insulinorésistance, ce qui suggère que la résistine humaine et murine ont des fonctions similaires malgré des sites de productions différents (Qatanani et al. 2009).

2.3.1.c. Inflammation

L'obésité est associée à un état inflammatoire permanent (dite inflammation à bas bruit) qui se caractérise notamment par une infiltration macrophagique au niveau du tissu adipeux que l'on ne retrouve pas chez une personne de poids normal (McArdle et al. 2013).

Les mécanismes facilitant l'infiltration de ces macrophages sont partiellement connus (Morinaga et al. 2012) avec notamment l'expression de gènes impliqués dans les voies de l'inflammation (Soronen et al. 2012) et l'attraction des monocytes, dont le facteur MCP-1 dont le niveau de sécrétion est augmenté chez les sujets obèses et diminué après une perte de poids (Kanda et al. 2006). Des analyses d'expression génique chez des souris nourries avec un régime hyperlipidique ont permis d'identifier plusieurs gènes surexprimés appartenant à des voies de signalisation de l'inflammation (Moraes et al. 2003). De façon intéressante, une étude a montré que cette infiltration macrophagique semble être empêchée par un régime à base d'huile de poisson riche en PUFA $\omega 3$ (Todoric et al. 2006).

Les interactions paracrines entre les macrophages et les adipocytes semblent être à l'origine de l'inflammation et de son maintien. Une alimentation riche en acides gras saturés a pour conséquence une libération plus importante d'acides gras par le tissu adipeux qui peuvent alors se lier aux Toll like receptor de type 4 (TLR4) présents sur les macrophages. Ces interactions activent alors le facteur de transcription NF κ B (Nuclear Factor-Kappa B) ce qui engendre une production accrue de cytokines TNF- α (Tumor necrosis factor) (Calder et al. 2011) et contribue ainsi au maintien de l'inflammation. L'activation de TLR4 est très fortement diminuée si les acides gras provenant du régime alimentaire sont des acides de type PUFA (Liu et al. 2013) (Figure 4).

L'interleukine (IL) 6 est une des cytokines pro-inflammatoires majeures dont le niveau d'expression augmente dans le tissu adipeux de souris ou de patients obèses. Le tissu adipeux viscéral est un site important de synthèse d'IL. Les concentrations d'IL-6 sont augmentées dans la circulation et au niveau du tissu adipeux de sujets obèses et diminuent au cours d'un régime hypocalorique (Bastard et al. 2000). Lumeng et coll. ont montré qu'il existe une surexpression du gène codant l'IL-6 dans les macrophages recrutés lors de l'inflammation provoquée par une obésité induite par un régime hyperlipidique (Lumeng et al. 2007). De plus, des souris CCR2^{-/-} (C-C chemokine receptor type 2, le récepteur macrophagique de MCP-1) soumises au même régime hyperlipidique ne montrent pas de surexpression d'IL-6.

Il est intéressant de noter qu'au cours de l'induction nutritionnelle de l'obésité chez la souris, l'infiltration macrophagique du tissu adipeux précède l'hyper-insulinémie, suggérant un lien de cause à effet entre la présence de macrophages dans le tissu adipeux et l'insulinorésistance (Xu et al. 2003). Cependant, chez l'Homme, le nombre de macrophages dans le tissu adipeux n'est pas nécessairement corrélé à l'insulinorésistance (Heilbronn & Liu 2014).

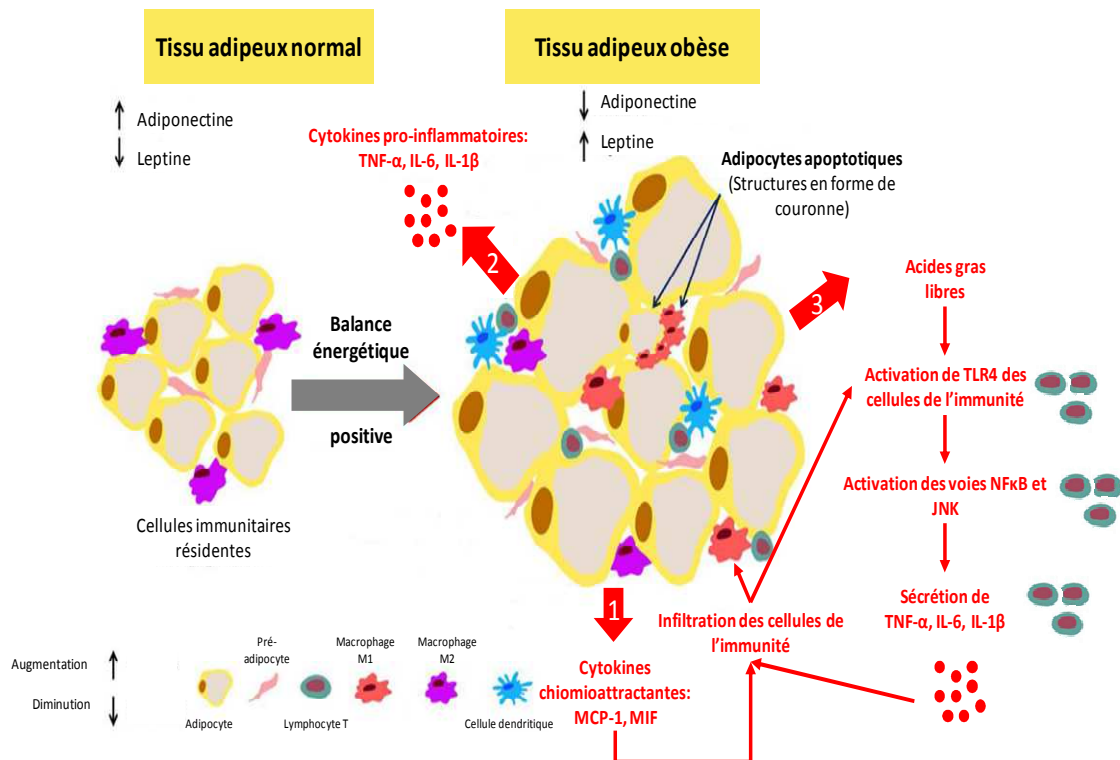


Figure 4 : Obésité et développement du tissu adipeux – Inflammation résultante et dérégulation métabolique. 1. Une balance énergétique positive conduit à une hypertrophie des adipocytes qui sécrètent alors des cytokines chimioattractantes telles que MCP-1 et MIF (macrophage migration inhibitory factor), provoquant l'acheminement des cellules immunitaires dans le tissu adipeux. 2. La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- α , IL-1 β et IL-6 par les adipocytes et les cellules de l'immunité favorise la multiplication de macrophages M1 pro-inflammatoires au niveau du tissu adipeux. 3. L'augmentation de la lipolyse adipocytaire conduit à une libération accrue d'acides gras libres qui activent les voies de signalisation de l'inflammation par régulation transcriptionnelle par le biais du facteur de transcription NF κ B. Il en résulte alors une sécrétion supplémentaire de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-1 β . L'ensemble de ces événements détériorent les voies de signalisation insulinémique et peuvent aboutir à une insulino-résistance. (D'après Maeve A. McArdle *Frontier in endocrinology* 2013).

2.3.1.d. Insulino-résistance

L'insuline joue donc un rôle essentiel dans le contrôle de la biodisponibilité des acides gras au niveau du tissu adipeux. Elle favorise l'assimilation du glucose et des acides gras par les adipocytes. Gnudi et coll. ont montré qu'un régime hyperlipidique de 13 semaines entraîne une diminution de 50% du taux du transporteur membranaire de glucose GLUT-4 dans le tissu adipeux combinée à une diminution du transport de glucose insulino-dépendant (Gnudi et al. 1995). Par la suite, Park et coll. ont montré qu'il existe une diminution de l'absorption glucidique insulino-dépendante de plus de 90% au niveau du tissu adipeux de souris C57BL/6 nourries avec un régime hyperlipidique pendant 3 semaines (Park et al. 2005). La nature des acides gras semble également intervenir dans l'insulino-résistance puisque les régimes à base de PUFA combiné avec une restriction calorique diminuent l'adiposité chez l'homme, favorisent l'oxydation lipidique et améliorent l'insulino-résistance (Kalupahana et al. 2011).

Cette altération du métabolisme glucidique et l'insulinorésistance qui en découle ont des causes multifactorielles dont une accumulation de métabolites issus du métabolisme des acides gras qui perturbent la signalisation insulinémique et le transport de glucose. Ainsi, le développement de l'obésité et de l'insulinorésistance provoque une augmentation de la lipolyse et une production accrue d'acides gras libres (Moro 2012). Ces acides gras libres peuvent activer les voies de signalisation pro-inflammatoires et empêcher le bon fonctionnement de la signalisation insulinémique du tissu adipeux.

Le facteur de nécrose tumorale ou TNF- α (Tumor Necrosis Factor alpha) a été la première cytokine identifiée au niveau du tissu adipeux de souris obèses. L'influence du TNF- α sur l'insulinorésistance a été rapportée sur des souris dont la synthèse de TNF- α ou de ses récepteurs a été inactivée. Elles présentaient alors une amélioration de la sensibilité à l'insuline dans des modèles d'obésité génétiques ou nutritionnels (Uysal et al. 1997). Des observations concordantes ont été faites chez l'humain : il a été constaté que les obèses présentaient une expression de TNF- α élevée dans le tissu adipeux et que la perte de poids était associée à une diminution de cette expression (Fernández-Veledo et al. 2009). Bien qu'initialement on pensait que le TNF- α soit principalement produit par les adipocytes, l'évolution parallèle de l'infiltration macrophagique et l'augmentation de l'expression de TNF- α chez les sujets obèses suggèrent qu'une fraction importante du taux de TNF- α du tissu adipeux pourrait dériver des macrophages et d'autres cellules du système immunitaire (Figure 5).

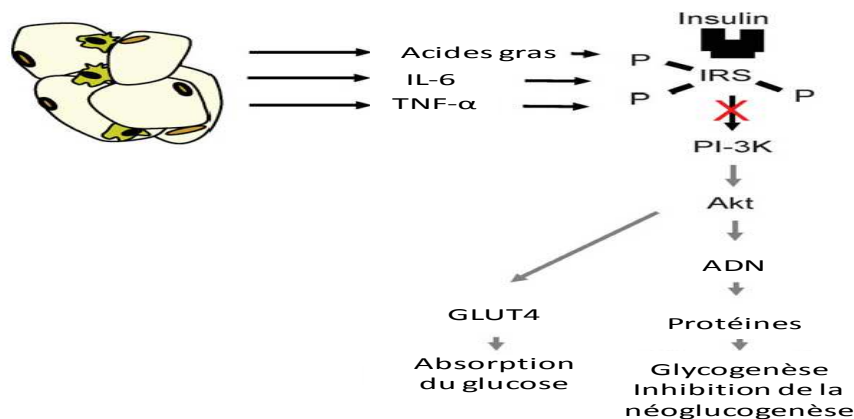


Figure 5 : Tissu adipeux et insulinorésistance. TNF- α , IL-6, IL-1 β et les acides gras libres induisent la phosphorylation de l'Insulin receptor substrat11 (IRS1) et de l'Insulin receptor substrat-2 (IRS2) qui diminue la capacité de ces protéines d'être phosphorylées par le récepteur à l'insuline (in vitro) et peuvent aussi inhiber l'activité d'autophosphorylation du récepteur à l'insuline (activité tyrosine-kinase), perturbant alors la cascade de signalisation qui en découle. On suppose que les acides gras libres agissent via l'activation d'isoformes de la protéine kinase-c (PKC) après formation de diacylglycérol. Le TNF- α agit via l'activation de la c-jun N-terminal kinase 1 (JNK).

2.3.1.e. Facteurs de transcription

i. PPAR- γ

Les facteurs de transcription de type PPAR (Peroxisome Proliferated-Activated Receptor) et SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) sont des régulateurs centraux impliqués dans le développement et le métabolisme des adipocytes (White & Stephens 2010).

Les PPAR sont des protéines de la superfamille des récepteurs nucléaires liant naturellement les lipides. Parmi les familles de PPAR existantes, PPAR- γ est principalement exprimé dans le tissu adipeux. Divers acides gras insaturés comme l'acide oléique (C18:1), linoléique (C18:2) ou linolénique (C18:3) sont capables de se lier à PPAR- γ . Les interactions entre ce facteur de transcription et ces ligands lipidiques entraînent une activation des gènes impliqués dans la différenciation des adipocytes, l'adipogenèse, l'inflammation, et l'absorption des acides gras (Barish GD J Clin Invest. 2006). Par ailleurs, l'activation de PPAR- γ entraîne une hyperplasie des adipocytes avec un passage simultané des triglycérides contenus dans les lipoprotéines circulantes vers les adipocytes (Maryam Ahmadian et al. 2013).

Enfin, ce facteur de transcription intervient également dans la régulation de l'expression de plusieurs molécules sécrétées par le tissu adipeux comme la leptine, la résistine, l'adiponectine et le TNF- α , ce qui influe, par conséquent, sur la sensibilité à l'insuline de l'individu (Chmielewska-Kassassir et al. 2012). L'activation de PPAR- γ est associée à un potentiel bénéfique sur l'expression et la sécrétion de plusieurs cytokines telles que l'adiponectine, la résistine, la leptine, l'IL-6, le TNF- α ou encore MCP-1 (Martin 2009).

ii. SREBP

Les SREBP sont des facteurs de transcriptions clés intervenant dans l'adipogenèse, la sensibilité à l'insuline et le métabolisme des acides gras (captage du cholestérol, des phospholipides, des triglycérides) (Jeon & Osborne 2012). L'isoforme SREBP-1c est principalement exprimé au niveau du tissu adipeux ainsi qu'au niveau du foie et du muscle squelettique. L'insuline est un des médiateurs de l'expression de SREBP-1c (Azzout-Marniche et al. 2000) et la quantité de SREBP-1c est dépendante de l'état nutritionnel de l'individu (Ribot et al. 2001; Osborne 2000). Ces rôles physiologiques de SREBP-1c en fonction de l'état nutritif de l'individu ont été observés sur les gènes de la FAS ou de l'ACC (Gosmain et al. 2005). Des rats soumis à un régime hyperlipidique pendant 9 semaines montrent une surexpression de SREBP-1c au niveau du tissu adipeux épидidymal (Kim & Park 2008).

2.3.2. Le foie

2.3.2.a. Stéatose hépatique

L'obésité induite par l'alimentation est associée à une accumulation de lipides dans le foie (principalement sous forme de triglycérides), ayant pour conséquence le développement de la stéatose hépatique ou de la NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease). Cette accumulation de lipides résulte d'un déséquilibre entre l'apport de lipides (via la circulation sanguine ou bien la synthèse *de novo*) et leur élimination (sécrétion de particules lipoprotéiques ou oxydation des acides gras) (Musso et al. 2009). Chez l'homme, cette augmentation de la concentration de triglycérides intra-hépatique est associée à un développement d'une insulino-résistance hépatique (Kawano & Cohen 2013) et est considérée comme un déterminant majeur du syndrome métabolique (Yki-Järvinen 2014).

2.3.2.b Insulino-résistance hépatique

L'association entre stéatose et insulino-résistance hépatique a notamment été démontrée sur le modèle animal. L'inhibition de la production hépatique de glucose insulino-dépendante est profondément altérée chez des rats nourris avec un régime hyperlipidique (Li et al. 2005). Les effets inhibiteurs de l'insuline sur la néoglucogenèse sont interrompus tandis que son action sur la lipogenèse *de novo* est renforcée conduisant à une hyperglycémie et une hypertriglycéridémie (Brown & Goldstein 2008).

Les mécanismes responsables de l'insulino-résistance dans le foie sont controversés et les liens de causalités ne sont pas encore clairement établis. L'augmentation d'acides gras libres dans le foie pourrait induire une insulino-résistance hépatique en favorisant la translocation de la protéine kinase-C (PKC) du cytosol vers la membrane empêchant la transduction du signal de l'insuline par le biais du complexe membranaire IRS-PI3K (Perry et al. 2014). De plus, l'augmentation de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par le tissu adipeux comme TNF- α et la diminution combinée de la sécrétion d'adiponectine ont aussi été impliquées dans cette insulino-résistance hépatique (Girard & Lafontan 2008).

2.3.2.c. Lipogenèse *de novo*

La lipogenèse *de novo* est la conversion des sucres issus de l'alimentation en acides gras. La lipogenèse *de novo* reste très active à jeun chez les personnes atteintes de NAFLD (Lambert et al. 2014) ce qui n'est pas le cas chez les individus sains, chez qui la lipogenèse n'est stimulée qu'en période postprandiale. Une alimentation de type hyperlipidique entraîne une interruption de la lipogenèse chez le rongeur (Duarte et al. 2014; Ferramosca et al. 2014).

2.3.3. L'intestin

C'est au niveau de l'intestin qu'a lieu la majorité des processus d'absorption. Les nutriments passent de la lumière intestinale à la circulation sanguine en pénétrant à travers la paroi de l'intestin, soit par diffusion, soit par transport facilité. Le développement de l'obésité induite par un régime alimentaire se traduit généralement par une altération de la structure de l'intestin ainsi que des processus physiologiques de digestion (Šefčíková et al. 2008). L'alimentation peut ainsi influencer sur la longueur de l'intestin, l'efficacité de l'absorption des nutriments ou encore l'activité enzymatique des entérocytes (Wiśniewski et al. 2015), ainsi que la perméabilité intestinale (Stenman et al. 2012).

2.3.3.a. Absorption lipidique

Petit et coll. ont montré que des souris soumises à un régime hyperlipidique pendant 6 semaines ont un contenu lipidique fécal identique aux souris soumises à un régime contrôle, ce qui traduit une plus grande capacité d'absorption des lipides (Petit et al. 2007). De plus, les souris soumises au régime hyperlipidique présentent une induction de l'expression de gènes impliqués dans l'absorption lipidique et la synthèse des lipoprotéines.

L'absorption lipidique est fonction de la surface absorbante totale et de la capacité absorbante des entérocytes. Des analyses microarrays effectuées par Petit et coll. montrent une surexpression des gènes impliqués dans l'absorption d'acides gras tels que FATP-4 et CD36, dans le transport intracellulaire des acides gras tel que FABP, dans la synthèse des lipoprotéines tels que APO-IV et MTP (Microsomal Triglyceride Transfer Protein). Ceci démontre qu'il existe une régulation adaptative des gènes et des protéines associées dans les processus permettant une plus grande absorption intestinale des lipides chez des souris soumises à un régime hyperlipidique. Une étude chez l'homme a également montré une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme lipidique intestinal suite à trois jours de régime hyperlipidique (Tremblay et al. 2013).

La surface absorbante intestinale est également impactée par un régime hyperlipidique. Il y a une augmentation de la prolifération des entérocytes qui pourrait déboucher sur une augmentation de la taille des villosités et de la surface absorbante. De plus, il existe une répression des gènes impliqués dans l'apoptose et une activation des gènes impliqués dans le cycle cellulaire, ainsi qu'une augmentation de la longueur des villosités et du nombre total de cellules par villosités (de Wit et al. 2008). Ces changements constituent un ensemble de processus permettant à l'intestin d'augmenter sa capacité absorbante des lipides alimentaires.

2.3.3.b. Oxydation lipidique

De Wit et coll. ont montré que plusieurs gènes codant pour l'oxydation des acides gras et sous contrôle de PPAR- α sont activés chez des souris sous régime hyperlipidique. Ces activations pourraient faire partie d'un processus de détoxification afin d'empêcher le surplus d'acides gras, dû à la consommation du régime hyperlipidique, d'altérer les fonctions des entérocytes (Wit et al. 2008). Cependant, l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'oxydation lipidique pourrait ne pas suffire à contrer les effets lipotoxiques du régime hyperlipidique puisque le régime hyperlipidique engendre l'apoptose des entérocytes de rats (Gniuli et al. 2008).

2.3.3.c. Sécrétion hormonale

Les analyses transcriptomiques de de-Wit et coll. ont également mis en évidence une activation de l'expression de certaines protéines sécrétées induite par le régime hyperlipidique, ce qui indique qu'il existe une modification de la communication entre l'intestin et d'autres organes comme le foie, les muscle et le tissu adipeux (Wit et al. 2008). L'intestin n'est pas seulement un organe absorbant mais sécrète aussi diverses hormones impliquées dans l'homéostasie énergétique et la satiété (Marić et al. 2014; Coate et al. 2014). Aussi, la présence de lipides dans l'intestin modifie le temps de transit (Al Mushref et al. 2013) et module la sécrétion de plusieurs hormones gastro-intestinales telles que la GLP-1 (Glucagon-like peptide 1) (incrétine qui stimule la production d'insuline), PYY, ou encore la CCK (Cholécystokinine) (Duca et al. 2013). Ces hormones sont impliquées dans la régulation des fonctions gastro-intestinales et l'absorption énergétique. Des souris sous régime hyperlipidique pendant 8 semaines affichent une faible quantité de GLP-1 plasmatique et montrent une faible réponse de GLP-1 à une charge de glucose oral (Anini et al. 2003) comparativement aux mêmes souris soumises à un régime contrôle. Des souris consommant un régime hyperlipidique dont 60% de l'énergie est apportée par des lipides, pendant 16 semaines, ont une concentration plasmatique de PYY plus faible à jeun et en période postprandiale que chez des souris maintenues sous régime pauvre en lipides (2.6% de l'énergie apportée par des lipides) (Le Roux et al. 2006).

2.3.4. Le muscle squelettique

Comme nous l'avons vu précédemment, le développement de la masse grasse qui caractérise l'obésité contribue à la lipotoxicité, à l'insulinorésistance et à l'inflammation à bas bruit. Ces trois mécanismes sont au moins en partie à l'origine des altérations observées au niveau du tissu musculaire squelettique lors de la consommation d'un régime hyperlipidique. Ils conduisent à une diminution de la masse musculaire associée à une réduction de la synthèse protéique au sein de ce tissu et une altération de la capacité oxydative du muscle.

2.3.4.a. Lipotoxicité musculaire

Comme mentionné plus haut, le surplus d'énergie lors de la consommation d'un régime hyperlipidique est stocké sous forme de triglycérides au niveau du tissu adipeux blanc. Cependant, lorsque la capacité de stockage du tissu adipeux est atteinte, les acides gras alimentaires s'infiltrant au niveau d'autres tissus, notamment le foie (cf. §2.3.2) et le tissu musculaire squelettique (Tagliaferri et al. 2014). Une accumulation ectopique excessive de triglycérides mais aussi de diglycérides peut ainsi conduire à des dysfonctionnements métaboliques dans les cellules composant ces tissus, voir la mort cellulaire : c'est la lipotoxicité .

Une augmentation de la synthèse protéique musculaire, et plus particulièrement de la synthèse protéique mitochondriale, a été observée chez le rat après 6 semaines de consommation d'un régime hyperlipidique. Ce régime comprenait majoritairement du saindoux mais aussi de l'huile de colza et de l'huile d'arachide (Chanséaume et al. 2007). De la même façon, après 16 semaines de consommation d'un régime hyperlipidique (majoritairement composé de saindoux), la synthèse protéique musculaire myofibrillaire et mitochondriale était augmentée en association avec une prise de masse musculaire (Masgrau et al. 2012). Cependant, après 24 semaines de régime hyperlipidique à base d'huile de colza et d'huile d'arachide il a été observé une réduction de la synthèse protéique et de la masse musculaire ainsi qu'une importante accumulation musculaire de lipides chez le rat (Masgrau et al. 2012). Lorsque l'exposition à un régime hyperlipidique est chronique, la lipotoxicité pourrait être à l'origine d'un effet catabolique et/ou d'une résistance à l'action anabolique, conduisant à une perte musculaire.

L'augmentation du stockage ectopique des acides gras dans le muscle squelettique est renforcée par une réduction de l'oxydation des lipides au niveau musculaire. Une altération de l'expression et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale couplée à une inhibition de la biogenèse mitochondriale, mécanisme qui permet d'augmenter la taille et le nombre de mitochondries, pourraient expliquer l'atteinte des activités oxydatives musculaires dans le développement de l'obésité (Jornayvaz & Shulman 2010).

2.3.4.b. Insulinorésistance

En période postprandiale, le muscle squelettique est le principal organe cible de l'absorption du glucose dans le corps. Une résistance à l'insuline a été observée chez des rats après 10 semaines de consommation d'un régime hyperlipidique (Tardif et al. 2014). L'insulinorésistance est caractérisée par la perte de la capacité cellulaire à répondre à l'insuline, qui se traduit par une diminution de l'absorption, de la prise en charge et de l'oxydation du glucose ainsi que de la synthèse de glycogène.

2.3.4.c. Inflammation

Le métabolisme musculaire est habituellement renforcé par l'action de certaines cytokines comme l'IL-6, qui en temps normal favorise l'activité de l'AMPK, l'oxydation des acides gras et l'absorption du glucose (Kelly et al. 2009). Cependant, lors du développement de l'obésité la signalisation musculaire d'IL-6 est perturbée et on observe une diminution de l'expression des récepteurs à l'IL-6 dans le muscle ainsi qu'une diminution subséquente de l'activation des voies de l'AMPK (Scheele et al. 2012). Par ailleurs, des souris transgéniques sur-exprimant IL-10 (une cytokine aux effets anti-inflammatoires) spécifiquement au niveau du muscle et soumises à un régime hyperlipidique ont une amélioration de leur sensibilité à l'insuline, une diminution de l'infiltration macrophagique dans le muscle, une diminution de la sécrétion d'IL-6 et de TNF- α comparativement à des souris contrôles (Hong et al. 2009).

3. Le microbiote intestinal

Le microbiote correspond à l'ensemble des micro-organismes peuplant un écosystème, c'est-à-dire un milieu de vie bien défini. Ainsi les organismes multicellulaires vivent en étroite association avec des microbes environnants et l'homme ne fait pas exception.

3.1. Le microbiote intestinal humain

Le corps humain héberge un grand nombre de bactéries, d'Archae, de virus et d'eucaryotes unicellulaires. La proportion de ces micro-organismes est telle que l'on estime que leur nombre est dix fois supérieur à la totalité de nos cellules. Ces microbiotes résident sur plusieurs sites de notre corps tels que la surface de la peau, les voies respiratoires, ou encore les voies urogénitales (Chiller et al. 2001; Huang et al. 2011; Neish 2009; Petrova et al. 2013). Mais le tractus digestif est la partie du corps humain qui en héberge le plus grand nombre. On estime qu'à lui seul, le côlon héberge 70% de l'ensemble des bactéries du corps humain.

Chez l'adulte, la masse microbienne totale du tractus gastro-intestinal (GI) de l'homme est estimée à 1,5 kg, ce qui représente à peu près 30 % de la masse totale du contenu intestinal (Xu & Gordon 2003). Ce tube digestif est divisé en plusieurs segments spécialisés présentant des conditions physicochimiques différentes qui conditionnent la diversité et l'abondance des micro-organismes le colonisant : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle (subdivisé en duodénum, jéjunum et iléon), le côlon, et le rectum (Figure 6).

Le nombre d'unités bactériennes présentes dans les différents compartiments du tractus gastro-intestinal n'est pas homogène, mais montre un continuum qui s'étend de 10^1 à 10^3 bactéries par gramme de contenu au niveau de l'estomac et du duodénum, progressant à 10^4 à 10^7 bactéries par gramme de contenu au niveau du jéjunum et de l'iléon et atteignant 10^{11} à 10^{12} bactéries par grammes de contenu au niveau du côlon (Figure 6).

L'estomac héberge très peu de bactéries endogènes car la plupart des micro-organismes ne résistent pas à l'acidité extrême ($\text{pH} \approx 2$) régnant au sein de l'estomac. Une étude sur la base de l'analyse des séquences d'ARNr 16S de 23 biopsies gastriques endoscopiques a cependant révélé la présence de bactéries appartenant aux groupes des *Proteobacteria*, des *Firmicutes*, des *Actinobacteria*, des *Bacteroidetes*, et des *Fusobacteria* (Bik et al. 2006).

Les premiers segments de l'intestin grêle (jéjunum et duodénum) sont pauvres en bactéries. Il semble que le péristaltisme intestinal particulièrement actif à ce niveau empêche les bactéries de s'y maintenir. Ainsi, 10^4 bactéries par grammes sont retrouvées au niveau de la lumière dans le duodénum contre 1000 fois plus dans l'iléon ($\approx 10^7$ bactéries par gramme). La plupart des micro-organismes retrouvés sont principalement des bactéries aérobies ou anaérobies facultatives (entérobactéries et streptocoques).

Enfin, au niveau de la partie terminale de l'intestin grêle, le potentiel d'oxydoréduction devient de plus en plus bas menant à une augmentation des populations anaérobies strictes (Hayashi et al. 2005). La densité et la diversité du microbiote atteignent leur maximum dans le côlon et notamment le côlon distal où sont retrouvées approximativement 10^{12} bactéries par

gramme de contenu (Savage 1977). Le microbiote est alors en majorité constitué de bactéries anaérobies strictes appartenant aux groupes des *Bacteroidetes* et des *Firmicutes*, réparties entre 500 et 600 espèces.

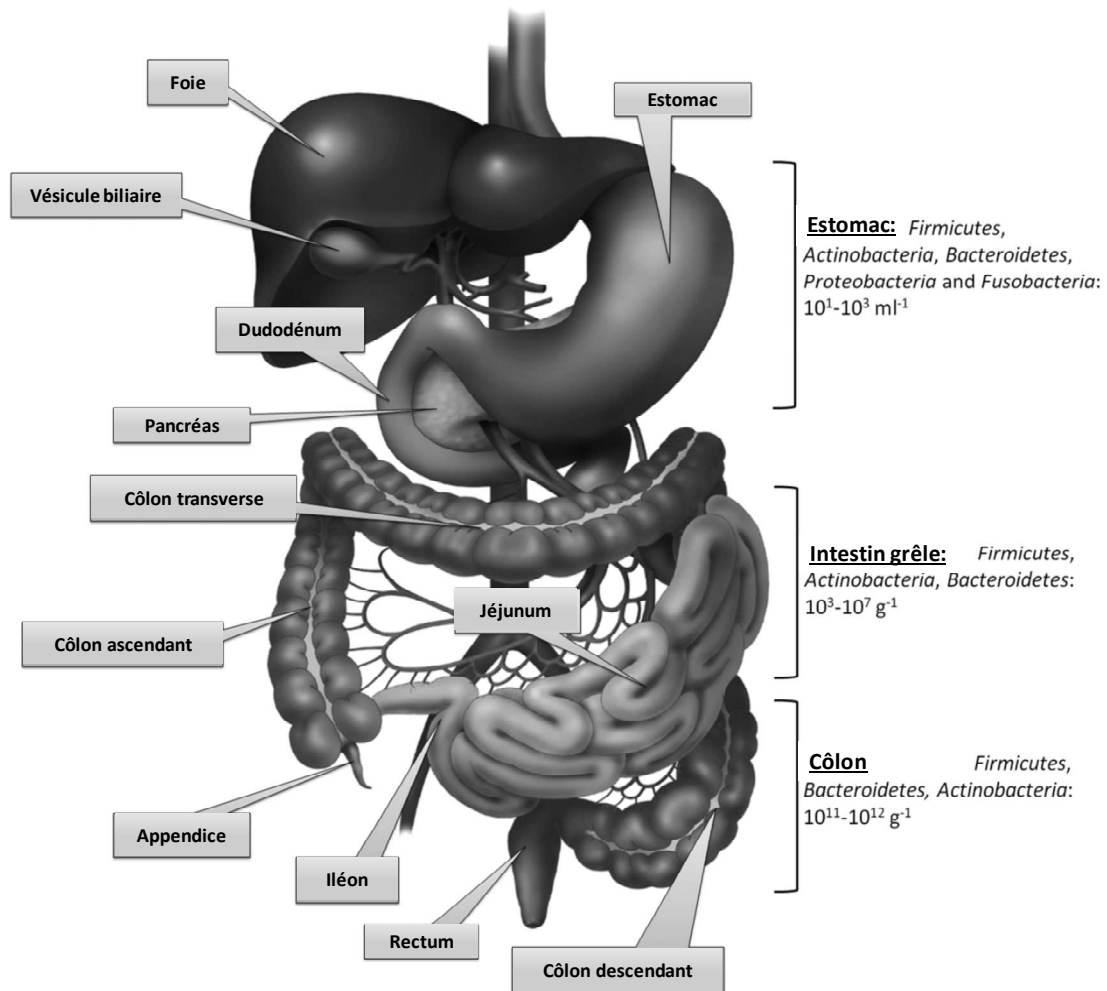


Figure 6: Anatomie du tractus digestif, principaux phyla bactériens, et leur abondance au sein de chaque niche. (D'après Marchesi Environmental Microbiology 2011 et Sekirov Physiol Rev 2010).

3.2. Structure et composition du microbiote intestinal

Les premières méthodes d'analyse du microbiote ont fourni les données initiales sur le nombre et la diversité des microorganismes cultivables peuplant le tractus digestif. Le nombre d'espèces bactériennes estimé alors aux alentours de 400 ne donnait qu'une vision très restreinte de la diversité du microbiote intestinal humain (Savage 1977). Les méthodes moléculaires basées sur l'ADN ribosomal ont permis par la suite des progrès importants dans la détection et l'identification des microorganismes. Il a alors été possible de détecter les bactéries non cultivables, et selon les études, environ 70 % du microbiote intestinal est non cultivable à ce jour (Amann et al. 1990; Zoetendal et al. 2004).

Les premiers catalogues des gènes de l'ARNr 16S du microbiote fécal humain ont mis en lumière la grande diversité de cet écosystème et un grand nombre d'espèces ne correspondant à aucune souche cultivée connue (Suau et al. 1999).

Au cours des dernières années, le séquençage à haut débit a donné une nouvelle dimension à l'étude de la composition du microbiote (Gill et al. 2006; Manichanh et al. 2006). Trois grands phyla rassemblent la plus grande part des bactéries dominantes de l'intestin : les *Firmicutes*, les *Bacteroides* et les *Actinobacteria*. Chaque phylum est subdivisé en classe, ordre, famille, genre et espèce. Au sein de ces phyla, la plus grande partie des espèces observées dans le microbiote d'un individu lui sont propres même si un petit nombre d'espèces (quelques dizaines) pourraient constituer un cœur phylogénétique interindividuel (Tap et al. 2009) et le profil des espèces dominantes semble stable pour un individu donné sur des échelles de temps allant jusqu' à plusieurs années (Martínez et al. 2013).

Le phylum des *Firmicutes* comporte ainsi plus de 200 genres. Les *Firmicutes* sont divisés en trois classes de bactéries Gram + : les *Clostridia* (anaérobie), les *Bacilli* (aérobie stricte ou facultatif) et les *Erysipelotrichi* (anciennement appelés Mollicutes). Le second phylum majoritaire est celui des *Bacteroidetes* composé de trois classes de bactéries Gram - : *Cytophaga*, *Flavobacterium* et *Bacteroidia*. (Tap et al. 2009). Le genre *Bacteroides* est le membre principal de la classe Bacteroidia, il comprend en particulier les espèces *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides dorei* et *Bacteroides ovatus* (Eckburg et al. 2005). Les *Actinobacteria* constituent le troisième phylum majoritaire, regroupant des espèces bactériennes Gram + à haut pourcentage en GC. Il ne représente qu'environ 3% des bactéries du microbiote. Les *Actinobacteria* comprennent en particulier le genre *Bifidobacterium*. Trois autres phyla sont rencontrés de manière plus limitée : celui des *Proteobacteria*, celui des *Lentisphaerae* et celui des *Verrucomicrobia* (Figure 7).

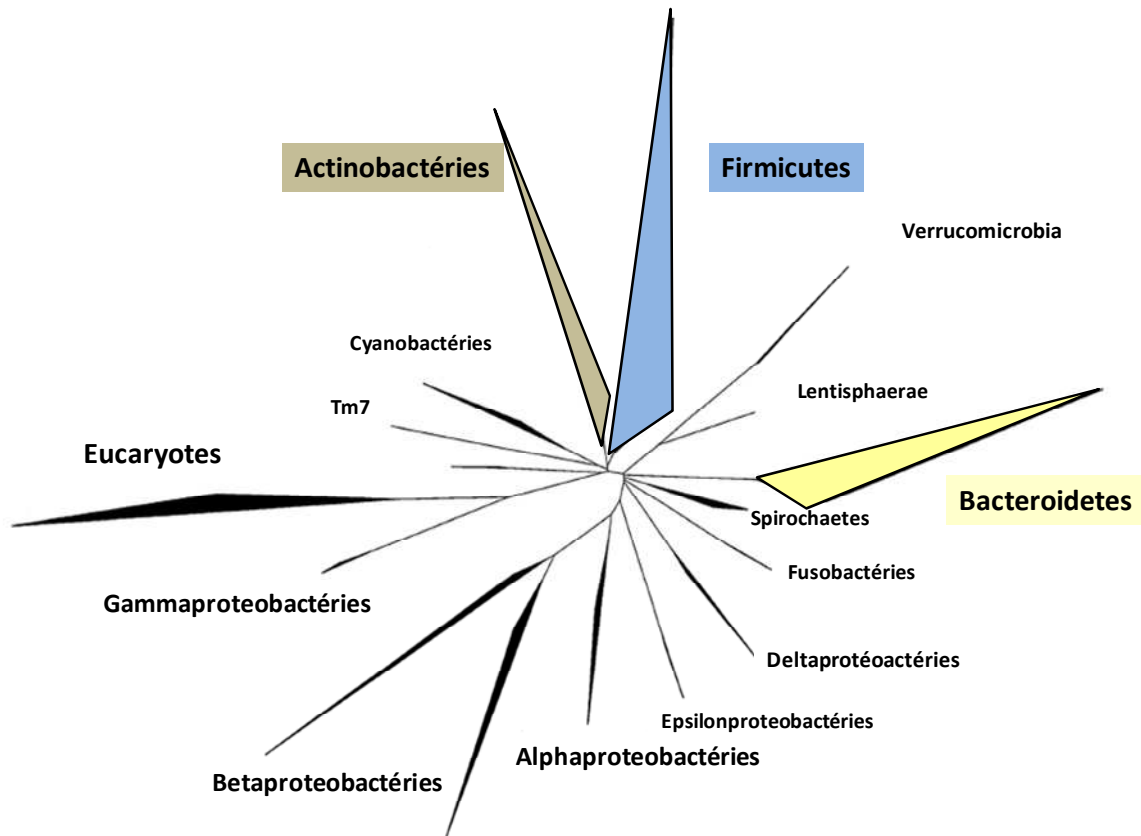


Figure 7 : Arbre phylogénétique du microbiote fécal représentant les groupes bactériens les plus souvent détectés. La surface des zones indique l'abondance et la diversité des groupes bactériens. (D'après Vrieze et coll. Diabetologia 2010).

Une importante étude menée par Arumugam et coll. (du consortium METAHIT) portant sur 39 individus de 6 nationalités différentes a permis de montrer que les individus se répartissent en trois groupes distincts, en fonction des bactéries contenues dans leurs intestins, ceci de manière indépendante de l'origine géographique, de l'état de santé (surpoids ou maladies inflammatoires du tube digestif), du sexe, ou de l'âge de ces individus. Cette classification, comme celle des groupes sanguins, est spécifique des individus, ce qui a amené les chercheurs à utiliser la notion d' « entérotypes » (Figure 8). Les analyses ont ensuite été étendues à 85 échantillons prélevés chez des populations danoises, puis à 154 issus de populations américaines, pour déterminer si cette classification était valable au-delà de ces 39 métagénomomes initiaux. Les résultats indiquent que tous ces individus peuvent être classés en 3 groupes distincts, selon la nature des bactéries contenues dans le tube digestif mais aussi des fonctions qu'elles codent. De façon intéressante, Arumugam et coll. n'ont pas trouvé de corrélation entre l'indice de masse corporelle et le ratio *Firmicutes*/*Bacteroides*, ni avec la composition des entérotypes (Arumugam et al. 2011).

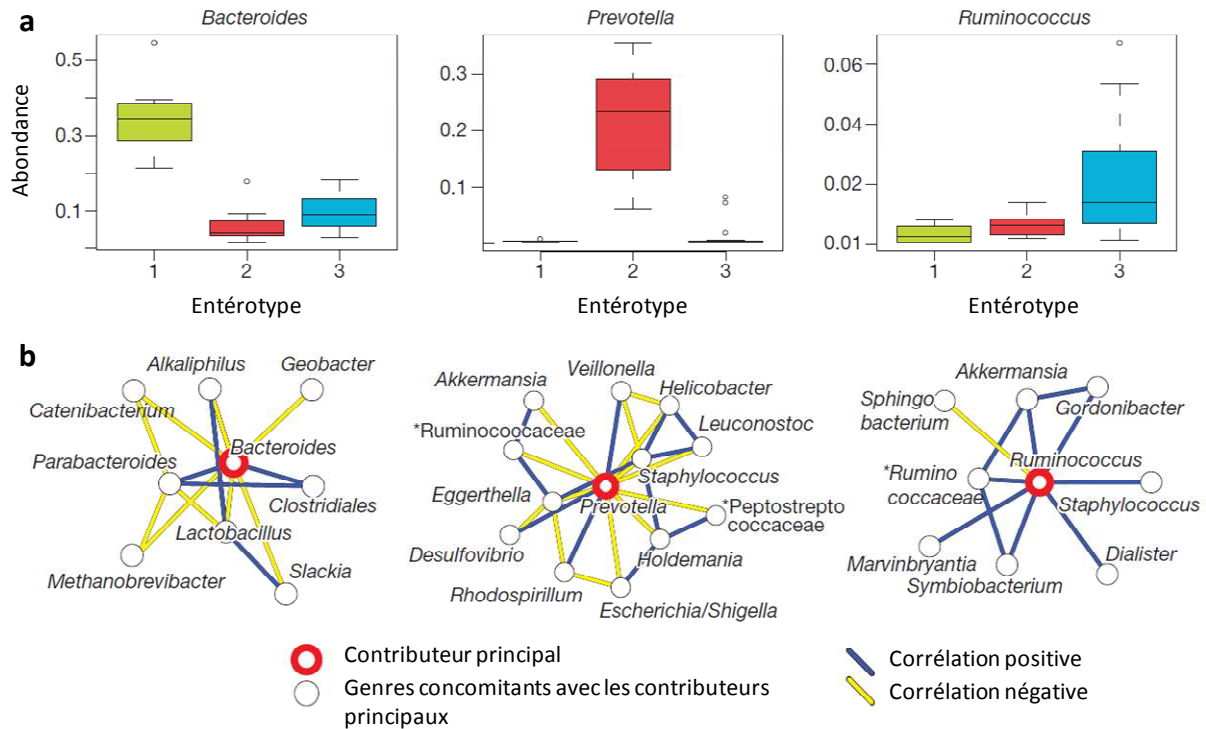


Figure 8 : Les entérotypes. **a.** Abondances des principaux contributeurs au sein de chaque entérotipe. **b.** Réseaux de co-occurrence des trois entérotypes. L'entérotipe 1 est dominé par le genre *Bacteroides*, l'entérotipe 2 est dominé par le genre *Prevotella* et l'entérotipe 3 est dominé par le genre *Ruminococcus*. (D'après Arumugam *et coll.* Nature 2011).

Les différences phylogénétiques et fonctionnelles entre ces entérotypes semblent refléter les différentes combinaisons de chaînes trophiques microbiennes au sein de ces clusters. L'entérotipe *Bacteroides* est ainsi associé à une extraction énergétique principalement issue de la fermentation des sucres et ce genre est riche en gènes codant la synthèse de la biotine (vitamine B7), de la riboflavine (vitamine B2) et de l'acide ascorbique (vitamine C). L'entérotipe *Prevotella* comprend une majorité d'espèces dégradant les glycoprotéines des mucines (protéines composants le mucus) de la muqueuse épithéliale et est riche en gènes codant la synthèse de la thiamine (vitamine B1) et de l'acide folique (vitamine B9). L'entérotipe *Ruminococcus* est également capable de dégrader les mucines (Arumugam *et al.* 2011).

Une autre étude portant sur un groupe de 98 individus de 2 à 50 ans a mis en évidence que deux de ces entérotypes seraient associés à une alimentation à long terme enrichie en protéines et lipides animaux (*Bacteroides*) ou en glucides (*Prevotella*) ; l'entérotipe *Ruminococcus* n'étant pas clairement défini vis-à-vis d'un régime alimentaire quelconque (Wu *et al.* 2011).

Cependant, et bien que l'analogie avec les groupes sanguins soit séduisante, le microbiote intestinal est dans un équilibre dynamique constant et varie en fonction d'un certain nombre de facteurs associés au mode de vie tels que le régime alimentaire (Serino *et al.* 2012), le stress (Dinan & Cryan 2012) ou encore la prise d'antibiotiques (Cotter *et al.* 2012). Plus récemment, le concept d'entérotypes a fait l'objet de plusieurs analyses distinctes qui mettent en évidence, non pas une variation discontinue au sein des populations mais un gradient de fonctionnalités d'espèces (Huse *et al.* 2012; Faust *et al.* 2012; Ian B. Jeffery *et al.* 2012). Huse *et coll.* ont analysé

les régions variables de l'ARNr 16S fécal de 200 individus sans pouvoir identifier les trois entérotypes. Ils ont identifié deux « biome types » *Bacteroides-Ruminococcus* et *Prevotella*, sans que la distinction entre ces deux groupes ne soit bien définie. Leurs résultats laissent ainsi apparaître un gradient (plutôt que des clusters) de genres et d'espèces avec un ratio continu *Bacteroides/Prevotella* entre les deux « biome types » (Huse et al. 2012).

L'histoire co-évolutive entre le microbiote et son hôte ainsi que les interactions complexes qui en découlent ont conduit à explorer l'hypothèse d'une redondance fonctionnelle au sein du microbiome intestinal. Ainsi, des espèces bactériennes différentes partagent des caractéristiques fonctionnelles et la grande quantité de bactéries au sein du microbiote intestinal permet la présence de toutes les fonctions indispensables au maintien de ce « super-organe ». Ainsi, malgré la différence de composition des microbiotes entre individus, les profils fonctionnels des différents microbiotes sont relativement semblables. (Figure 9)

Le premier catalogue de gènes du microbiome intestinal publié par Qin et coll. a souligné les fonctions importantes pour la survie des bactéries intestinales (le métagénome « minimal ») et l'existence d'un noyau fonctionnel (le « core » métagénome), impliqué dans l'homéostasie de l'écosystème dans sa globalité, conservé entre chaque individu de la cohorte (n=124), malgré une spécificité inter-individuelle élevée du microbiote intestinal (Qin et al. 2010). Les fonctions du métagénome « minimal » sont présentes au sein de la quasi-totalité des espèces bactérienne du microbiote tandis que les fonctions du « core » métagénome sont présentes au sein de chaque individu. Le « core » métagénome peut-être considéré comme un ensemble de gènes bactériens nécessaire au maintien de l'écosystème symbiotique intestinal. Dans cette étude, 38% des gènes bactériens d'un individu sont partagés par au moins 50% de la cohorte, mettant en évidence un niveau élevé de similitudes fonctionnelles entre les individus. Ce pourcentage tombe toutefois à 9% si l'on considère les gènes partagés par au moins 80% de la cohorte.

Le métagénome minimal comporte ainsi des fonctions nécessaires au métabolisme bactérien telles que le métabolisme du carbone, la synthèse des acides aminés, et des complexes protéiques majeurs (ADN polymérase, ARN polymérase, ATP synthase). Le « core » métagénome contient essentiellement des fonctions associées à la dégradation des sucres complexes et des glycanes issus de l'alimentation ou de la muqueuse intestinale, ainsi que des voies de dégradation et d'absorption de la pectine et du sorbitol, c'est-à-dire des sucres omniprésents dans les fruits et légumes, mais qui ne sont pas (ou mal) absorbés par l'hôte. Cette capacité de dégradation des sucres complexes pourrait avoir été sélectionnée au sein du microbiote en tant que source d'énergie non-compétitive entre l'hôte et son microbiote.

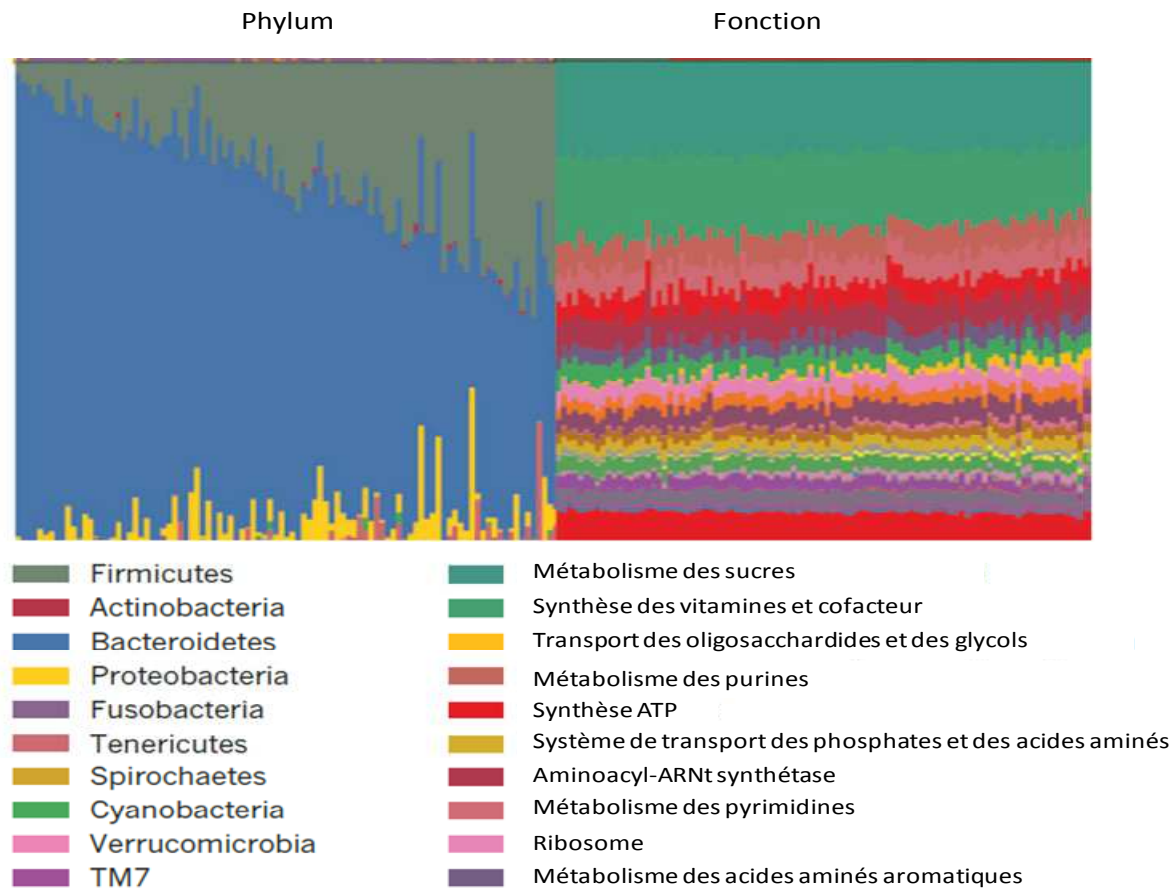


Figure 9 : La redondance fonctionnelle du microbiote intestinal. A gauche : les analyses de l'ARNr 16S du microbiote fécal de 242 individus montrent une grande diversité d'abondance des phyla bactériens. A droite : les même échantillons analysés par le séquençage de type « shotgun » montrent de grandes similarités de fonctions entre les individus. (D'après The Human Microbiome Project Consortium Nature 2012).

3.3. Régulation de la composition du microbiote

3.3.1. Facteurs influençant la mise en place du microbiote au cours de l'enfance

Le fœtus serait stérile lorsqu'il est dans l'utérus et serait colonisé par les bactéries au moment de la naissance. Cependant, bien que cette idée soit largement acceptée par la communauté scientifique, certaines études tendent aujourd'hui à prouver le contraire (Jiménez et al. 2005; Jiménez et al. 2008). Quoi qu'il en soit, l'établissement du microbiote est un processus dynamique en plusieurs phases qui permet, si elles sont réalisées, l'émergence d'un microbiote stable contribuant à l'homéostasie énergétique de l'individu et à un système immunitaire pleinement fonctionnel.

Pendant et juste après la naissance, l'enfant est exposé à un grand nombre de sources environnementales de bactéries (vagin, peau, lait de la mère, etc.). Ce microbiote initial évolue beaucoup au cours des premiers mois en raison de l'exposition continue à des bactéries de l'environnement. Lors d'une naissance par voie basse, les nouveau-nés sont rapidement colonisés

par les microbiotes vaginal et fécal de leur mère, tandis que les enfants nés par césarienne sont quant à eux initialement colonisés par les bactéries de l'air, des vêtements et de la peau de leur mère et du personnel soignant. En conséquence, les enfants nés par césarienne présente un microbiote différent et ont une plus faible proportion de bifidobactéries et de *Bacteroides spp* et sont plus souvent colonisés par *Clostridium difficile* que les enfants nés par voie basse. Par ailleurs, les microbiotes de jumeaux monozygotes ou dizygotes sont aussi proches entre eux, ce qui suggère que la colonisation du tractus digestif par un microbiote issu d'une même mère est un facteur plus déterminant dans le devenir du microbiote adulte que l'empreinte génétique de l'individu (Turnbaugh, Hamady, et al. 2009; Tims et al. 2013).

Le microbiote se diversifie au cours des deux premières années ce qui coïncide avec le passage d'une alimentation liquide à base de lait riche en lipides, à une alimentation solide, plutôt riche en glucides. La composition du microbiote adulte conserve alors un noyau stable au cours de la vie de l'individu (Palmer et al. 2007).

3.3.2. Diversification alimentaire

L'alimentation constitue une partie du substrat énergétique du microbiote intestinal. Elle module des processus physiologiques impactant le microbiote (sécrétion d'enzymes digestives, de mucus, vitesse du transit, système immunitaire...). De ce fait, l'alimentation est un des déterminants majeurs de la modulation du microbiote intestinal et le régime alimentaire, qu'il soit bénéfique ou néfaste, est un sujet d'intérêt très important dans les programmes de recherche internationaux.

Lors de la diversification alimentaire du nourrisson, les deux principaux phyla *Bacteroidetes* et *Firmicutes* surpassent en nombre ainsi qu'en diversité les *Actinobacteria* et les *Proteobacteria* implantés précédemment. Les études divergent sur le moment (d'une à quatre années) où le microbiote intestinal du nourrisson peut être considéré comme celui de l'adulte (Yatsunencko et al. 2012). Ainsi certaines études ont montré que l'adolescent possède un microbiote légèrement différent de celui de l'adulte avec une plus forte abondance des bactéries appartenant aux genres *Bifidobacteria* (phylum des *Actinobacteria*) et des *Clostridia* (phylum des *Firmicutes*) que celui de l'adulte (Agans et al. 2011).

La mise en place du microbiote s'accompagne aussi de changements métaboliques. En effet, alors que les capacités fermentaires du microbiote conduisent à une production de lactate et d'acétate pendant les premiers mois de la vie, les concentrations de butyrate et de propionate augmentent et se stabilisent dès la deuxième année de la vie.

3.4. Influence du microbiote intestinal sur son hôte

Le microbiote intestinal assure de nombreuses fonctions essentielles à la santé de son hôte, au point que le microbiote est aujourd'hui considéré comme un organe supplémentaire du corps humain. La nature et la quantité des substrats disponibles pour la fermentation par le microbiote intestinal font parties des facteurs environnementaux majeurs susceptibles d'influencer l'équilibre de l'écosystème microbien. Les principales sources de carbone et d'énergie du microbiote sont représentées par les glucides et les protéines d'origine alimentaire, non digérés dans la partie supérieure du tractus digestif et parvenant au côlon. Une grande variété de substrats est donc disponible pour le microbiote colique, contribuant au maintien de la diversité microbienne au sein de l'écosystème.

L'ensemble de ces réactions de fermentation permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et au maintien de leurs fonctions cellulaires. Ces activités microbiennes sont, de plus, importantes pour l'hôte, puisque les métabolites formés sont, pour la plupart, absorbés et utilisés dans l'organisme et ont ainsi des répercussions sur la nutrition et la santé.

3.4.1. Fonctions métaboliques du microbiote intestinal

3.4.1.a. Métabolisme des glucides par le microbiote intestinal

Les glucides complexes non digestibles parvenant au côlon sont majoritairement constitués d'amidon résistant aux α -amylases de l'hôte, de polysaccharides végétaux (cellulose, hémicelluloses et certaines pectines) ainsi que quelques autres types de glucides (certains édulcorants, oligosides, etc.) (Cummings et al. 1991). La fermentation de ces composés implique différents groupes bactériens aux activités enzymatiques complémentaires et possédant des enzymes non produites par l'hôte (Xu et al. 2013). Les polymères sont tout d'abord hydrolysés par certains groupes bactériens en oses ou oligosaccharides (microbiote hydrolytique), qui peuvent alors être assimilés par d'autres groupes bactériens ne possédant pas ces hydrolases (microbiote glycolytique) (Figure 10).

Malgré la diversité des glucides disponibles issus de cette première étape d'hydrolyse et des espèces susceptibles de les fermenter, les substrats glucidiques sont catabolisés par le microbiote selon un nombre relativement restreint de voies métaboliques. La majorité des espèces du microbiote utilisent la glycolyse pour convertir ces glucides en pyruvate, qui est ensuite transformé en AGCC (acides gras à chaîne courte : acétate, propionate et butyrate) et en gaz selon différentes voies métaboliques (Figure 10). Certaines espèces libèrent des métabolites intermédiaires tels que le succinate, le lactate ou le formate qui sont métabolisés par d'autres espèces bactériennes (Flint et al. 2007). La fermentation de ces glucides non digestibles constitue une source d'énergie non négligeable pour l'hôte puisque les AGCC permettent à l'hôte de récupérer jusqu'à 10% d'énergie supplémentaire.

Les produits finaux de la fermentation sont rapidement absorbés par l'épithélium intestinal et métabolisés *in situ* ou dans d'autres organes (foie, muscles, cœur). Dans l'intestin, les AGCC contribuent ainsi au maintien des fonctions de la barrière épithéliale notamment par la régulation de la prolifération cellulaire de l'épithélium et la modulation de la réponse immunitaire (Brown et al. 2011; Pryde et al. 2002). Le butyrate est également utilisé au niveau de l'épithélium colique en tant que substrat énergétique du métabolisme cellulaire où il est oxydé en corps cétonique et CO₂. Par ailleurs le butyrate peut influencer sur l'expression de gènes dans les cellules de l'épithélium colique, en agissant comme un inhibiteur des histones désacétylases.

Les AGCC régulent également la balance entre la synthèse et l'oxydation des acides gras ainsi que la lipolyse. L'oxydation des acides gras est activée par les AGCC tandis que la synthèse *de novo* et la lipolyse sont inhibées. Il en résulte une diminution de la concentration d'acides gras plasmatique (Ge et al. 2008). Les AGCC favorisent l'activité de l'AMPK dans le muscle et dans le foie (Bjursell et al. 2011). L'activation de l'AMPK déclenche l'expression du cofacteur PGC-1 α , qui contrôle l'activité de facteurs de transcriptions tels que PPAR α , PPAR δ ou encore PPAR γ (den Besten et al. 2015) qui interviennent dans la régulation du métabolisme du cholestérol, des lipides et du glucose.

Enfin, les AGCC interviennent dans la régulation de l'expression de gènes en se liant à des récepteurs couplés à des protéines G : GPR41 (ou FFAR3) et GPR43 (ou FFAR2). Des expérimentations *in vitro* ont montré que le butyrate se fixe préférentiellement sur GPR41, l'acétate sur GPR43 et le propionate se fixe indifféremment sur les deux récepteurs (Brown et al. 2003; Le Poul et al. 2003). Les voies de signalisations qui découlent des interactions entre les AGCC et GPR43 au niveau des granulocytes neutrophiles participent ainsi à la modulation de la réponse inflammatoire (Maslowski et al. 2009; Sina et al. 2009). Ces interactions modulent également la sécrétion de l'hormone GLP-1 (hormone hypoglycémisante qui favorise la sécrétion d'insuline) au niveau des cellules L de l'intestin (Tolhurst et al. 2012). GPR43 intervient dans le stockage des lipides dans le tissu adipeux. Des souris GPR43^{-/-} sont obèses sous un régime contrôle tandis que des souris surexprimant GPR43 dans le tissu adipeux sont protégées d'une obésité induite par un régime hyperlipidique (Kimura et al. 2013). Ces résultats mettent en avant GPR43 dans un rôle de capteur d'énergie alimentaire excessive, contrôlant ainsi l'utilisation de l'énergie du corps tout en maintenant l'homéostasie métabolique. L'hypothèse mécanistique proposée est que l'activation de GPR43 dans le tissu adipeux par les AGCC supprimerait la signalisation insulinémique ce qui inhiberait le stockage des lipides dans le tissu adipeux et favorise le métabolisme du glucose et des lipides dans d'autres tissus. Une infusion d'acétate diminue le taux d'acides gras libres circulants chez la souris conventionnelle et la souris *ob/ob* (Ge et al. 2008) mais ces effets antilipolytiques sont abolis chez des souris GPR43^{-/-}, ce qui suggère que l'activation de GPR43 par l'acétate est un mécanisme de régulation contrôlant la lipolyse et la concentration des acides gras libres circulants. Les souris Gpr43^{-/-} sont résistantes à l'obésité et à l'insulinorésistance induites par un régime hyperlipidique, ceci étant au moins partiellement dû à l'action régulatrice de Gpr43 sur la dépense énergétique (Bjursell et al. 2011). De plus, la stimulation de Gpr43 par les AGCC limite l'inflammation dans des modèles de colites, d'arthrite et d'asthme (Maslowski et al. 2009). Dans ces modèles, Maslowski et coll. ont montré que les souris axéniques, n'ayant pas d'AGCC compte tenu de l'absence de fermentation dans leur système digestif, présentent des niveaux d'inflammation comparables à ceux de souris Gpr43 KO. La voie Gpr43 semble être donc un des liens entre microbiote intestinal, régime alimentaire et système immunitaire.

Par ailleurs, les interactions entre les AGCC et GPR41 induisent la sécrétion de PYY, une hormone impliquée dans la sensation de satiété (Tazoe et al. 2009), ce qui a pour effet de ralentir le transit intestinal et donc d'améliorer l'absorption des nutriments. L'inactivation du gène codant pour GPR41 chez des souris axéniques n'affecte pas la prise de poids. Chez les souris conventionnelles, cette inactivation entraîne une diminution de la prise de poids par rapport aux souris sauvages. Cette diminution est aussi retrouvée chez des souris axéniques colonisées avec *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Methanobrevibacter smithii*, deux espèces bactériennes couramment rencontrées dans le microbiote intestinal et produisant des AGCC (Samuel et al. 2008). Ceci est associé à une forte diminution de l'expression de PYY, un transit intestinal plus rapide et une efficacité d'extraction de l'énergie à partir des aliments moindre. Il a également été montré que GPR41 est un médiateur de la synthèse de leptine induite par les AGCC (Zaibi et al. 2010).

La supplémentation d'un régime hyperlipidique en butyrate (Gao et al. 2009)(Gao Z, Yin J, Diabetes 2009) ou en acétate (Yamashita et al. 2007) supprime le gain de poids sans diminution de la prise alimentaire et améliore l'insulinorésistance chez le rongeur. Par ailleurs, le propionate a été signalé comme diminuant la prise alimentaire chez l'homme mais les médiateurs moléculaires n'ont pas été identifiés à l'heure actuelle (Arora et al. 2011). Le butyrate et le propionate réguleraient le poids corporel au moins partiellement par l'inhibition de la prise alimentaire, conformément à leurs effets stimulants sur les hormones intestinales anorexigènes. En revanche, l'acétate inhibe le gain de poids sans diminuer la prise alimentaire et sans avoir une action clairement définie sur les hormones gastro-intestinales (Lin et al. 2012).

L'équilibre entre les différentes espèces bactériennes influe sur les quantités et les proportions d'AGCC produits par la fermentation d'un même substrat. L'acétate, par exemple, est synthétisé par la majorité des espèces dominantes du microbiote (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Fusobacterium*...). Le propionate quant à lui, est principalement produit par les espèces du genre *Bacteroides*. Les espèces productrices de butyrate ont été identifiées plus récemment et appartiennent aux genres *Eubacterium*, *Coproccoccus*, *Roseburia* et *Faecalibacterium*. Le lactate est produit par ce qu'on appelle communément les bactéries lactiques : *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* et *Enterococcus*.

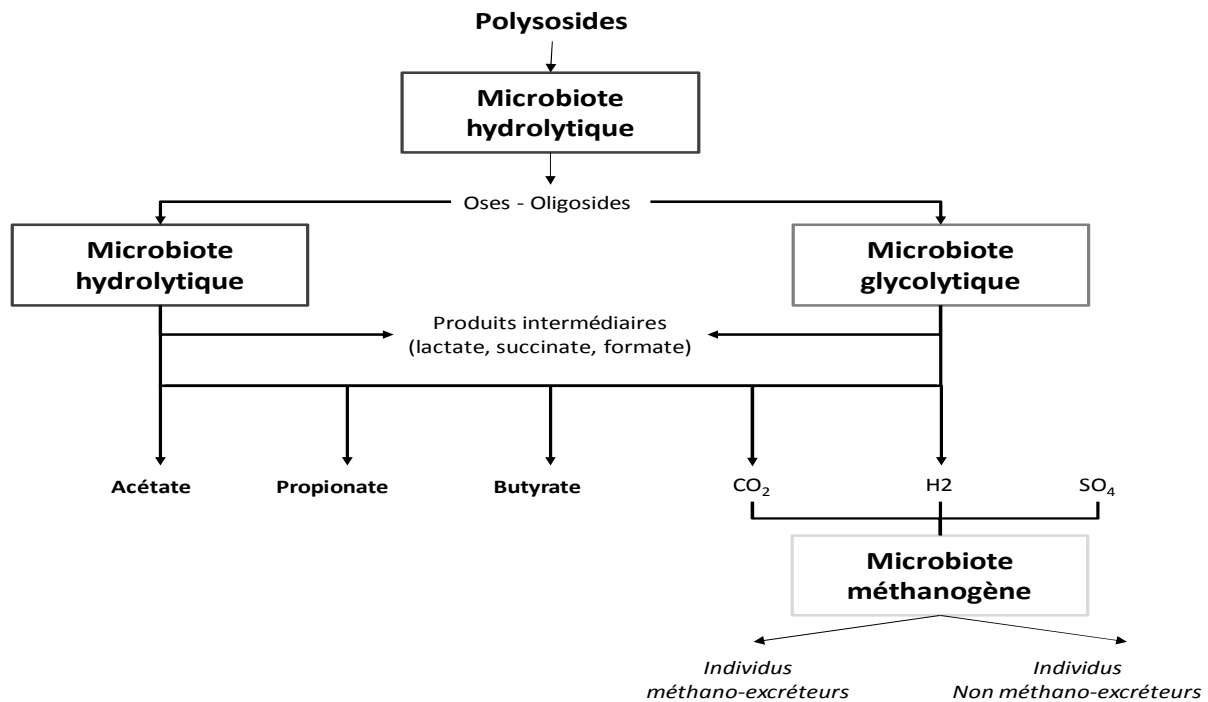


Figure 10 : Schéma global de la chaîne trophique de dégradation et de fermentation des glucides par le microbiote intestinal. (D'après Rambaud et coll. Flore microbienne intestinale 2004).

3.4.1.b. Métabolisme des protéines par le microbiote intestinal

A l'opposé de la fermentation des glucides, la dégradation des protéines dans le côlon génère de nombreux métabolites potentiellement toxiques pour l'hôte (phénols, indoles, ammoniacque, amines). Cette biodégradation fait également intervenir un nombre important d'interactions bactériennes, les espèces impliquées possédant des activités complémentaires (protéases, désaminases, transaminases...). Les protéines et les peptides étant la principale source azotée dans le côlon, les bactéries doivent hydrolyser ces polymères pour disposer des carbones et de l'azote qui les composent. Un nombre important d'espèces coliques est capable d'utiliser les acides aminés. Parmi celles-ci, certaines espèces des genres *Veillonella*, *Peptococcus*, *Fusobacterium*, *Acidaminococcus*, *Clostridium* et *Eubacterium* utilisent les acides aminés comme source principale d'énergie, ces bactéries ne fermentant pas les glucides. Toutefois, de nombreuses espèces glycolytiques utilisent les acides aminés et les peptides uniquement comme source d'azote.

La principale voie de fermentation des acides aminés dans le côlon est la désamination, conduisant à la production d'AGCC et d'ammoniacque. La plus grande partie de l'ammoniacque produit est rapidement absorbée, métabolisée en urée par le foie et excrétée dans l'urine. L'ammoniacque est un composé potentiellement toxique pour l'hôte et pourrait en particulier être impliqué dans les mécanismes d'initiation du cancer colique. La concentration en ammoniacque dans le côlon résulte d'un équilibre entre la désamination des acides aminés par les bactéries et l'utilisation du NH_3 libéré par les cellules pour leurs biosynthèses. La fermentation des glucides, en stimulant la protéosynthèse bactérienne, contribue, avec l'absorption par la muqueuse, à la diminution de la concentration intraluminaire de NH_3 . La désamination des acides aminés aromatiques conduit à la production de composés phénoliques tels que le phenylpropionate (issu

de la tyrosine), le phenylacétate (issu de la phénylalanine), et l'indole et le propionate (issus du tryptophane). Les composés phénoliques sont absorbés et détoxifiés par les cellules coliques, puis excrétés dans les urines. Les bactéries responsables de ces transformations sont les bactéries appartenant aux genres *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* (Scott et al. , 2013).

3.4.1.c. Métabolisme des lipides par le microbiote intestinal

Les acides gras alimentaires sont essentiellement absorbés dans l'intestin grêle humain. Cependant une étude a montré que 7% des C¹³ marqués au niveau des acides gras provenant de l'alimentation sont excrétés dans les selles (Gabert et al. 2011) et on estime que la quantité de lipides totaux qui parviennent dans le côlon en conditions physiologiques se situe entre 5 et 8 g par jour, auxquels il faut rajouter les lipides bactériens et ceux provenant de la desquamation des colonocytes. Les acides gras parvenant dans le côlon subissent alors de multiples transformations (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) grâce à l'action de bactéries du microbiote intestinal. De nombreuses espèces bactériennes possèdent ainsi des lipases permettant d'hydrolyser les triglycérides à chaînes longues. Cependant, tous les acides gras ne subissent pas ces transformations puisque les acides gras insaturés à 18 carbones sont réduits par le microbiote intestinal, tandis que les acides gras à 20 ou 22 carbones ne seraient pas métabolisés ou du moins de façon bien moins efficace (Howard & Henderson 1999). Enfin, certaines bactéries Gram-positives, possèdent des activités phospholipasiques leur permettant d'hydrolyser les phospholipides différant par la spécificité de leurs substrats (lipides endogènes provenant de la bile ou provenant des colonocytes) et par leurs produits d'hydrolyse. Certains de ces produits, tels les diglycérides et les inositol triphosphates, peuvent pénétrer dans les cellules de l'hôte et agir comme messagers intracellulaires, en particulier au sein de voies de signalisation qui contrôlent l'expression de gènes (Schmiel & Miller 1999).

Par ailleurs, le côlon reçoit jusqu'à 1 g par jour de cholestérol dont 70 % provient de la bile, 20 % de la fraction de l'alimentation non absorbée au niveau de l'intestin grêle et les 10 % restants de la desquamation des muqueuses intestinales. Le microbiote est capable de convertir le cholestérol en coprostanol, non absorbé au niveau intestinal et éliminé dans les fèces. Chez la majorité des individus, 70% du cholestérol est métabolisé par le microbiote, par contre, chez une minorité de personnes, celui-ci est très peu métabolisé (moins de 20%) (Wilkins & Hackman 1974). Il a récemment été montré que ces différences individuelles s'expliquaient par des différences de niveaux de population de bactéries capables de réduire le cholestérol (Veiga et al. 2005). Cependant les bactéries responsables de ce métabolisme restent peu connues. En 2007, notre équipe a isolé et caractérisé la première souche bactérienne issue du microbiote fécal humain capable de métaboliser le cholestérol. Cette souche est étroitement apparentée à l'espèce *Bacteroides dorei* (Gérard, Lepercq, et al. 2007). Au final, si ce métabolisme pourrait limiter l'absorption du cholestérol et donc le risque de maladies cardiovasculaires, l'impact réel du métabolisme microbien intestinal du cholestérol sur la santé humaine n'a jusqu'à présent fait l'objet d'aucune étude.

Les acides biliaires sont synthétisés par le foie à partir du cholestérol (acides biliaires primaires) et sont ensuite conjugués à la glycine ou à la taurine. Ils sont alors absorbés par l'iléon puis transportés par la veine porte au foie où ils sont à nouveau excrétés dans la bile (c'est le cycle

entéro-hépatique). Ils participent la fragmentation des lipides alimentaires conduisant ainsi à la formation de microgouttelettes (micelles) ce qui facilite alors la digestion des lipides par la lipase pancréatique. Cette émulsion facilite alors la digestion des lipides par la lipase pancréatique au niveau du duodénum. Environ 5% des sels biliaires échappent à ce cycle et parviennent au côlon où ils sont métabolisés par le microbiote en acides biliaires dit secondaires (Gérard et al. 2007; Ridlon et al. 2006). Plus de 20 acides biliaires ont ainsi été mis en évidence dans les fèces humaines, ce qui démontre la grande variété de conversions possibles des acides biliaires par le microbiote intestinal.

3.4.1.d. Synthèse de vitamines

Les vitamines sont des micronutriments nécessaires en faible quantité au métabolisme d'un organisme vivant, et qui ne peuvent être synthétisées en quantité suffisante par l'organisme. Il est maintenant reconnu que les bactéries intestinales sont une source importante de vitamines pour l'Homme, en particulier la vitamine K et plusieurs vitamines du groupe B (Hill 1997) telles que la thiamine (vit B1), la riboflavine (B2), la piridoxine (B6), la biotine (B8), l'acide folique (B9) ou la cobalamine (B12).

3.4.2. Influence du microbiote intestinal sur le système immunitaire

Le système immunitaire intestinal joue un rôle très important dans la physiologie des mammifères : il empêche l'invasion des tissus par les micro-organismes résidents et est donc d'une importance fondamentale pour la préservation de la nature symbiotique de ces interactions. Ce système fait face à une grande charge microbienne continue très diverse combinée à une vaste surface d'échange. Son rôle étant de maintenir l'homéostasie intestinale, ceci implique:

- Une réponse immunitaire forte contre les virus, bactéries et parasites pathogènes.
- Une tolérance vis-à-vis des bactéries du microbiote intestinal tout en modulant la composition de ce dernier.

Pour ce faire il doit d'abord développer des réponses protectrices humorale¹¹ et cellulaire¹² dirigées contre les virus, les bactéries ou les parasites entéro-pathogènes (Mowat 2003). Parallèlement à cette fonction protectrice, le système immunitaire intestinal doit également empêcher l'induction de réponses immunes envers les composants des aliments et des bactéries commensales présentes dans le tube digestif. Ce phénomène est nommé la tolérance orale (Round & Mazmanian 2009).

L'influence du microbiote intestinal sur le système immunitaire de l'hôte a initialement été mise en évidence grâce à l'étude de rongeurs dépourvus de microbiote intestinal. L'étude de ces rongeurs a ainsi permis d'élucider quelques-uns des mécanismes par lesquels le microbiote

¹¹ Immunité humorale : Immunité adaptative liée aux lymphocytes B et à la production d'anticorps.

¹² Immunité cellulaire : Immunité adaptative dans laquelle les lymphocytes T jouent un rôle central.

intestinal participe à la maturation et à la modulation du système immunitaire. Les animaux axéniques présentent en effet de nombreuses anomalies au niveau du système immunitaire intestinal : hypoplasie des plaques de Peyer¹³ (Macpherson & Harris 2004), nombre de lymphocytes intraépithéliaux réduits (Bouskra et al. 2008), concentration d'immunoglobulines sériques et production de cytokines limitées (Macpherson & Harris 2004) (Macpherson Nat Rev Immunol 2004). Les anomalies observées ne se limitent cependant pas à l'épithélium intestinal, puisque la rate et les ganglions lymphatiques des animaux axéniques sont non structurés et présentent des zones lymphocytaires atrophiées (Macpherson Nat. Rev. Immunol 2004). L'ensemble de ces anomalies peut être réparé en quelques semaines en inoculant un microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques. Par ailleurs, le microbiote participe à l'inflammation dite physiologique de l'intestin, qui se traduit par la présence continue de cellules inflammatoires dans la paroi intestinale et la production de cytokines (Figure 3.7). Le microbiote régule le niveau de cette inflammation physiologique : par exemple, un traitement antibiotique entraîne une augmentation du niveau inflammatoire (Verdu et al. 2006); il a été également démontré que le butyrate produit par des bactéries commensales était capable de moduler la voie NF- κ B en inhibant la dégradation de son inhibiteur I κ B. Ceci diminue la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-12, IL-8, TNF- α) et permet le maintien de l'homéostasie (Magalhaes et al. 2007).

Certains des mécanismes mis en jeu ont été établis et il a par exemple été montré que le polysaccharide A de *Bacteroides fragilis* était capable, à lui seul, d'induire la maturation du système immunitaire de souris axéniques (Mazmanian et al. 2005); ou encore que le peptidoglycane des bactéries Gram positives induit la formation de follicules lymphoïdes (Bouskra et al. 2008) au niveau de l'épithélium intestinal. Cependant, certaines espèces du microbiote intestinal possèdent également la capacité de susciter l'inflammation sous certaines conditions (Round & Mazmanian 2009; Kamada, Seo, et al. 2013). Le microbiote a donc la possibilité de commander des réponses pro- et anti-inflammatoires et la composition du microbiote intestinal est associée au bon fonctionnement du système immunitaire (Duerkop et al. 2009; Purchiaroni et al. 2013). Une altération de la composition du microbiote augmente le risque de pathologies inflammatoires ou d'infections (Kamada, Chen, et al. 2013). Ainsi, dans le cas des maladies inflammatoires de l'intestin telles que la maladie de Crohn ou le syndrome de l'intestin irritable, la comparaison du microbiote de sujets sains et de patients atteints montre une différence de composition avec une proportion plus grande de bactéries appartenant aux phyla des *Bacteroidetes* (Walker et al. 2011) et des *Protéobactéries* (Frank et al. 2007) et une plus faible proportions de bactéries appartenant aux phylum des *Firmicutes* et plus précisément de l'ordre des *Clostridiales* (Baumgart et al. 2007) et des *Lachnospiraceae* (Baumgart et al. 2007) ainsi que du genre *Faecalibacterium* (Andoh et al. 2012).

Le microbiote intestinal participe à cette modulation de la réponse immunitaire et contribue à protéger l'hôte contre les pathogènes : les bactéries commensales bloquent l'accrochage des bactéries pathogènes sur les sites de liaison de l'intestin, première étape de la pathogénicité (Maynard et al. 2012). De plus, la production d'IgA par les lymphocytes B, induite par l'interaction entre les bactéries commensales et les cellules dendritiques, limite la pénétration des

¹³ Les plaques de Peyer sont des agrégats de follicules lymphoïdes situés à intervalles réguliers dans la partie terminale de l'iléon. Ces follicules lymphoïdes, composés en grande partie de lymphocytes B et de lymphocytes T, sont séparés de la lumière intestinale par des cellules épithéliales particulières, appelées cellules M. Le tout forme la plaque de Peyer.

bactéries, et donc notamment des pathogènes, dans la muqueuse (immunité humorale) (Cerf-Bensussan et al. 2010) (Figure 11). D'autre part, les lymphocytes intraépithéliaux permettent de maintenir l'intégrité de l'épithélium intestinal (immunité cellulaire) (Figure 12).

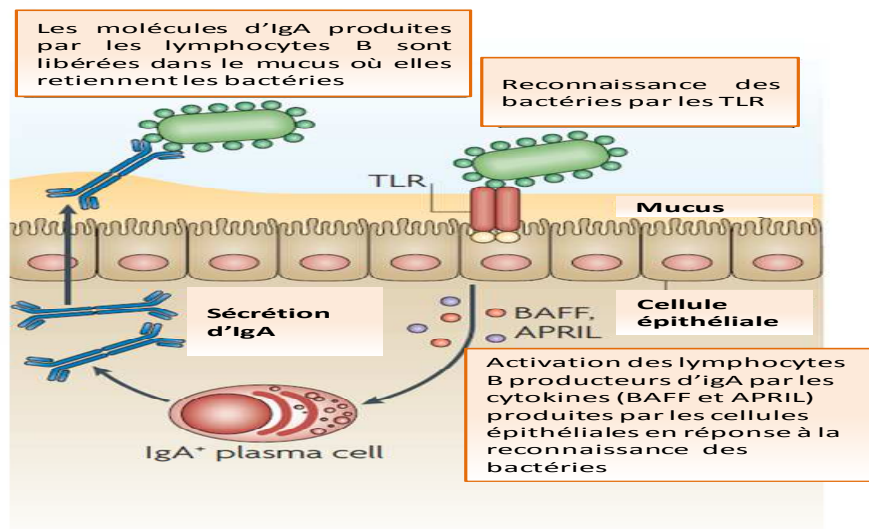


Figure 11 : Production d'IgA par le système immunitaire. La reconnaissance des antigènes par les Toll like Receptors, récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales, entraîne une libération de cytokines (B Cell Activating Factor (BAFF) et Proliferation Inducing Ligand (APriL)) qui, à leur tour, activent la production d'IgA par les lymphocytes B. Les IgA sont alors libérés dans le mucus où ils forment des complexes immuns qui empêchent la pénétration des bactéries. (D'après Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010).

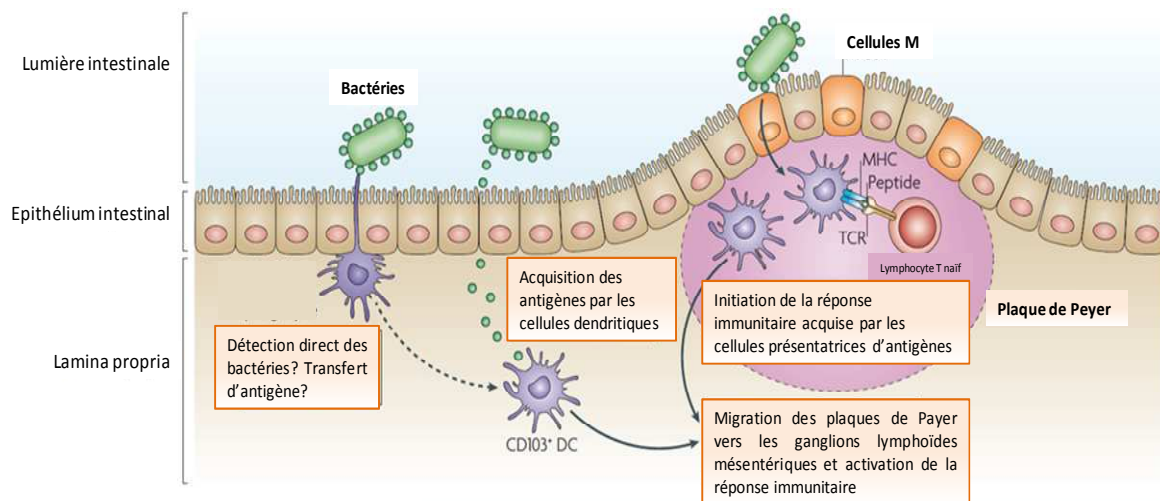


Figure 12 : Modulation de la réponse immunitaire par le microbiote intestinal. La reconnaissance des antigènes bactériens par les Toll Like Receptor (TLR), récepteurs présents sur la membrane des cellules épithéliales et des cellules dendritiques est surtout réalisée dans les plaques de Peyer, structures lymphoïdes composées de lymphocytes associés à des cellules épithéliales particulières : les cellules M. Ces cellules réalisent l'échantillonnage des antigènes bactériens. Les lymphocytes et les cellules dendritiques activés dans les plaques de Peyer migrent ensuite vers les organes lymphoïdes mésentériques où ils activent, à leur tour, la réponse immunitaire. (D'après (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010). Il a également été suggéré que les cellules dendritiques aillent directement au contact des bactéries et réalise ainsi un transfert d'antigène (mais ces résultats sont controversés à l'heure actuelle).

3.4.3 Influence du microbiote sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les MICI (maladie de Crohn, rectocolite hémorragique...) sont des pathologies qui résultent d'une réaction immunitaire exacerbée contre le microbiote intestinal chez des sujets prédisposés génétiquement. En effet, de nombreux arguments convergent en faveur de la responsabilité du microbiote intestinal dans l'induction et l'entretien de l'inflammation observée au cours des MICI. Néanmoins, à l'heure actuelle les données disponibles permettent seulement d'établir le constat d'un éventuel lien entre microbiote et MICI.

L'étude de la composition du microbiote des patients MICI fait apparaître une dysbiose. En effet, de nombreuses données font état de variation des différents phyla bactériens au sein du microbiote associé à la muqueuse et du microbiote fécal des malades (Sartor 2008). Les patients atteints de MICI ont une augmentation de la concentration bactérienne dans l'intestin par rapport aux patients sains (Kaur et al. 2011). D'autre part, la redistribution du microbiote intestinal chez les malades est également visible au niveau tissulaire avec une colonisation importante des cryptes intestinales et une augmentation de la présence bactérienne au sein de la muqueuse. Une altération de l'occupation du mucus par les *Lactobacilles* et les *Bifidobactéries* est notamment observée au cours de la Rectocolite hémorragique (Vigsnaes et al. 2013). Par ailleurs, la variation de la composition du microbiote (associé à la muqueuse et fécal) des patients atteints de MICI s'accompagne d'une baisse de la biodiversité de nombreux phyla souvent d'autant plus prononcée dans les zones inflammatoires de l'intestin. En effet, la composition du microbiote fécal des patients atteints de la maladie de Chron par exemple, présente 30% de bactéries inhabituelles, une réduction de la diversité des *Firmicutes* importante (dont le groupe *Clostridium leptum* comprenant *Faecalibacterium prausnitzii*), une diminution des *Bifidobacteria* et *Lactobacilli* et une augmentation des *Enterobacter* (Seksik 2010). Par ailleurs, les échantillons de microbiote, isolés des patients atteints de maladie de Chron se caractérisent par des propriétés d'adhérence cellulaire plus importantes que ceux des contrôles. Cette observation a mené à l'identification d'*Escherichia coli* adhérent-invasif (AIEC). Cette bactérie serait un agent amplificateur de l'inflammation (Strober 2011).

3.4.4 Influence du microbiote intestinal sur la physiologie du système digestif

L'observation du tube digestif des rongeurs axéniques révèle plusieurs anomalies : un temps de transit gastro-intestinal très lent, un caecum très volumineux et une muqueuse intestinale amincie, évoquant un rôle possible du microbiote dans le développement et la maturation des tissus du tube digestif. Les études à l'échelle tissulaire confirment cette hypothèse. En effet, on peut observer un ralentissement du renouvellement de l'épithélium et un moindre niveau de glycosylation des glycoprotéines du mucus chez les animaux axéniques (Gérard & Bernalier-Donadille 2007). A l'inverse, la colonisation de souris axéniques par un microbiote complexe (Cherbuy et al. 2010) ou par une bactérie productrice d'acétate *Bacteroides thetaiotaomicron* stimule la prolifération et la différenciation des cellules épithéliales et favorise la production de mucus (Wrzosek et al. 2013).

Le microbiote intestinal est également impliqué dans l'angiogenèse intestinale. La densité vasculaire de l'intestin est ainsi plus faible chez les souris axéniques. Une densité normale pouvant

être restaurée en quelques jours en colonisant le tube digestif soit avec un microbiote complet de souris, soit avec une espèce bactérienne dominante, *B. thetaiotaomicron* (Stappenbeck et al. 2002).

3.5 Microbiote et obésité

Ces dernières années, les travaux de la communauté scientifique ont mis en évidence le rôle du microbiote intestinal dans les processus métaboliques tels que le contrôle de l'homéostasie énergétique (Vrieze et al. 2010). Comme nous l'avons vu, l'obésité n'est donc pas seulement une question de mode de vie et de prédisposition génétique. Si la modification du mode de vie au cours des dernières décennies, marquée par une alimentation plus riche et une diminution de l'activité physique, joue assurément un rôle dans le développement de l'obésité et s'il ne fait pas de doutes que des variants de certains gènes prédisposent à la maladie, il est maintenant admis que d'autres facteurs sont nécessaires pour expliquer l'augmentation constante de sa prévalence au cours des dernières décennie, et le microbiote intestinal a été récemment identifié comme l'un de ces facteurs environnementaux (Cani & Delzenne, 2009; Larsen et al. 2010; Ley et al., 2006; Ridaura et al. 2014).

3.5.1. Obésité et dysbiose

Des expérimentations ont été menées chez des lignées de souris transgéniques déficientes pour le gène codant la leptine et prédisposées au développement de l'obésité (souris *ob/ob*). Ces animaux ne peuvent plus produire de leptine et, en conséquence, deviennent hyperphagiques et obèses.

Un inventaire exhaustif des séquences du gène de l'ARNr 16S a été obtenu à partir du contenu du cæcum des souris obèses *ob/ob*, minces *ob/+*, et minces *+/+*. À la suite de l'analyse de plus de 5 000 séquences, Ley et coll. (Ley et al. 2005) ont constaté une réduction de 50% des *Bacteroidetes* et une augmentation proportionnelle des *Firmicutes* chez les souris obèses comparativement aux souris minces. La modification de la composition du microbiote cæcal n'était pas liée à celle du nombre de bactéries ni au lien de parenté ou au sexe des souris *ob/ob*. Plus récemment, Murphy et coll. ont également observé une augmentation du nombre de *Firmicutes* chez des souris conventionnelles soumises à un régime hyperlipidique et chez des souris *ob/ob* nourries avec un régime low-fat (Murphy et al. 2010).

Les études chez l'homme ont elles aussi confirmé que les proportions des grandes familles bactériennes dans le microbiote intestinal diffèrent entre personnes obèses et personnes minces. La première étude du lien entre microbiote intestinale et l'obésité chez l'homme a été réalisée en 2006 par Jeffrey Gordon et son équipe. Ils ont comparé les microbiotes d'humains obèses et minces. Ils ont observé que les sujets obèses hébergeaient une moindre proportion de *Bacteroidetes* et plus de *Firmicutes* que les sujets minces (Ley et al. 2006), comme cela avait été décrit chez la souris (Ley et al. 2005). Afin de savoir si la composition du microbiote pouvait changer lorsque les personnes obèses maigrissent, les 12 sujets obèses de l'étude ont été soumis à un régime hypocalorique appauvri soit en lipides soit en glucides. La perte de poids a permis de restaurer un

profil bactérien similaire à celui des sujets minces indépendamment du type de régime consommé (Ley et al. 2006). Par ailleurs, plus la perte de poids était importante plus la proportion de *Bacteroidetes* dans leur microbiote augmentait. Une autre étude réalisée chez des jumeaux adultes a confirmé que les sujets obèses présentaient une plus faible proportion de *Bacteroidetes* dans leur microbiote que les sujets minces. Cependant, cette diminution de *Bacteroidetes* était également associée à une plus grande proportion d'*Actinobacteria* tandis que les proportions de *Firmicutes* ne différaient pas entre obèses et non-obèses (Turnbaugh, Hamady, et al. 2009). Cependant, d'autres études n'ont pas observé de différences entre les personnes obèses et les personnes minces dans les proportions de *Bacteroidetes* (Duncan et al. 2008) ou ont noté une plus grande proportion de cette population chez les individus obèses (Schwiertz et al. 2010)(Schwiertz A obesity 2010).

Aruguman et coll. ont également montré, en utilisant certains gènes bactériens comme biomarqueurs, qu'il existe des corrélations entre ces marqueurs fonctionnels et des caractéristiques telles que l'âge, le sexe, l'origine géographique ou la masse corporelle des individus (Arumugam et al. 2011). Ils ont ainsi identifié 3 biomarqueurs fortement associés avec l'indice de masse corporelle de l'hôte, deux de ces marqueurs étant des complexes ATPase ; suggérant ainsi que les fonctions dérivées de ce métagénome bactérien pourraient être plus importantes que la structure phylogénétique en elle-même.

Récemment, une étude métagénomique menée par le consortium international MetaHit a porté sur une cohorte de 292 adultes danois comprenant 123 personnes non-obèses et 169 obèses. Il ressort que deux groupes d'individus se distinguent selon le nombre de gènes microbiens présents dans leur microbiote (Le Chatelier, Nielsen, Qin, Prifti, Hildebrand, Falony, et al. 2013). Un quart des individus sont « pauvres » en espèces bactériennes, avec un microbiome de moins de 500 000 gènes bactériens, tandis que le reste de la population héberge un microbiote plus diversifié comprenant 600 000 gènes en moyenne. Les personnes (obèses ou non) ayant une plus faible diversité microbienne ont un risque plus important de développer des complications liées à l'obésité (diabète de type 2, stéatose hépatique) que les personnes ayant une diversité microbienne plus grande. Au niveau phylogénétique, les individus « riches » en espèces bactériennes ont une plus forte proportion de *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria* et *Euryarchaeota* tandis que les individus « pauvres » en espèces bactériennes ont une plus forte proportion de *Proteobacteria* et de *Bacteroidetes*. De plus, la clusterisation des gènes fait ressortir 9 espèces particulièrement représentative permettent de distinguer les communautés « riches » des communautés « pauvres en bactéries » : *Clostridium bolteae*, *Clostridium clostridioforme*, *Coprococcus entactus*, *Clostridium ramosum*, *Clostridium symbiosum*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Methanobrevibacter smithii*, *Ruminococcus gnavus* et *Roseburia inulinivorans*. Les individus « pauvres » en bactéries ont une plus forte proportion de *C. bolteae*, *C. symbiosum*, *C. clostridioforme*, *C. ramosum* et *R. gnavus* ; tandis que les individus « riches » en bactéries ont une plus forte proportion de *F. prausnitzii*, *R. inulinivorans*, *C. entactus* et *M. smithii*.

Une étude menée par le consortium français MicroObes portant sur une cohorte de 49 adultes français obèses ou en surpoids a confirmé les résultats de l'étude MetaHit : les communautés bactériennes « pauvres » et « riches » dans les deux populations françaises et danoises sont similaires. Par ailleurs, cette étude a montrée que la prise d'un régime pauvre en calories (riche en fibres et en protéines) permet une augmentation de la richesse des communautés bactériennes intestinales initialement pauvres (Cotillard et al. 2013) associée à une amélioration des caractéristiques cliniques des individus (perte de poids, amélioration de la

sensibilité à l'insuline, diminution du taux de triglycérides plasmatiques). Cependant, l'inflammation chronique n'a pas pu être corrigée par le régime chez les individus « pauvres » en espèces bactériennes aussi efficacement que chez les individus « riches » en espèces bactériennes. Il demeure cependant à déterminer si ces modifications de la composition du microbiote associées à l'obésité sont une cause ou une conséquence de la surcharge pondérale.

3.5.2 Microbiote et obésité : cause ou conséquence ?

3.5.2.a. Les animaux axéniques

De nombreuses études, la plupart fondée sur l'utilisation et l'observation d'animaux dépourvus de microbiote intestinal (animaux dits axéniques) ont montré la contribution de ce microbiote dans le développement de l'obésité et des pathologies associées.

Plusieurs études ont suggéré que le microbiote intestinal puisse exercer un rôle essentiel dans le développement de la masse grasse et dans l'altération de l'homéostasie énergétique. La première étude proposant cette hypothèse a révélé que les souris axéniques sont plus minces que des souris du même âge hébergeant un microbiote depuis leur naissance. Les souris conventionnelles ont 42% de masse grasse en plus que les souris sans germes. La conventionnalisation des souris axéniques avec un microbiote intestinal induit une augmentation de 60% de la masse grasse en deux semaines malgré une réduction de la prise alimentaire de 30% (Bäckhed et al. 2004).

Le microbiote intestinal semble donc être un élément clé du contrôle de ce stockage des graisses. L'équipe de J. Gordon et coll. ont ainsi observé que les souris axéniques avaient non-seulement une masse grasse plus faible que des souris conventionnelles mais également que ces souris restaient minces en réponse à un régime riche en graisse (Bäckhed et al. 2007). Par ailleurs, notre équipe a également montré que des souris axéniques soumises à un régime hyperlipidique prenaient trois fois moins de poids que des souris conventionnelles nourries de la même façon (Rabot et al. 2010)(Rabot FASEB 2010). Qui plus est, leur métabolisme des sucres et des graisses étaient différents : les souris axéniques ainsi nourries présentaient moins de sucres et d'insuline dans le sang et régulaient mieux leur glycémie. Ces souris avaient également moins de triglycérides et de cholestérol dans le sang et plus de cholestérol dans le foie.

En effet, le microbiote intestinal stimule le stockage des triglycérides circulants dans les adipocytes en réprimant au niveau intestinal la sécrétion d'un inhibiteur de la LPL (lipoprotéine lipase) appelé ANGPTL4 (Angiopoietin-like protein 4, anciennement nommé FIAF). Ainsi, les souris $ANGPTL4^{-/-}$ ne voient leur masse grasse augmentée que de 10% par la conventionnalisation (contre 57% pour les souris sauvages). Enfin, les souris axéniques $ANGPTL4^{-/-}$ ne sont pas protégées contre l'obésité induite par un régime de type « western » (Bäckhed et al. 2007). L'augmentation de l'activité de la LPL qui découle de la répression d'ANGPTL4 par le microbiote a pour conséquence une augmentation de l'apport d'acides gras dans les adipocytes et de l'accumulation de triglycérides. ANGPTL4 est donc un médiateur

supplémentaire de la régulation du métabolisme lipidique de l'hôte par le microbiote intestinal (Figure 3.8).

Par ailleurs, l'activité d'oxydation des acides gras au niveau du foie et des muscles est augmentée chez les souris axéniques, ce qui est le résultat de deux mécanismes complémentaires et indépendants. D'une part, le taux élevé d'ANGPTL4 circulant chez ces souris (comparativement aux souris conventionnelles) induit une élévation du niveau d'expression de PGC-1 α (Peroxisomal proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α), un co-activateur transcriptionnel impliqué dans l'oxydation des acides gras. D'autre part, ces souris montrent une augmentation de l'activité de l'AMPK, indépendant d'ANGPTL4. L'AMPK une enzyme très conservée chez les eucaryotes, est un senseur métabolique de la cellule. Cette enzyme active plusieurs enzymes de la β -oxydation mitochondriale telles que CPT1 et ACC. Bäckhed et coll. ont mis en évidence que chez les souris axéniques, la concentration de la forme activée d'AMPK est particulièrement élevée dans le foie et dans les muscles (Bäckhed et al. 2007). Cette activation de la voie AMPK stimule les voies métaboliques qui produisent de l'ATP (glycolyse et oxydation des acides gras), inhibe les voies métaboliques consommant de l'ATP (synthèse d'acides gras et de triglycérides, stimulation de la sécrétion d'insuline) et augmente la sensibilité hépatique à l'insuline. Le microbiote affecte donc tous ces processus via l'AMPK (Figure 13). Les mécanismes exacts par lesquels le microbiote agit sur l'activation d'AMPK dans les muscles et le foie sont encore inconnus mais semblent être indépendants d'ANGPTL4 étant donné que le niveau d'AMPK n'est pas affecté par l'inactivation d'ANGPTL4 (Bäckhed *pnas* 2007).

3.5.2.b. Transfert de microbiote

Afin de déterminer si le microbiote pourrait jouer un rôle causal dans le développement de l'obésité, le contenu cæcal de souris *ob/ob*, dont le rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* est élevé, a été transplanté chez des souris axéniques. L'augmentation de la graisse corporelle de ces animaux a été plus élevée que celle constatée chez des souris inoculées au moyen du contenu cæcal d'une souris mince (Turnbaugh et al. 2006). Dans la même étude, une comparaison des microbiotes «obèse» et «mince» au niveau du métagénome a montré que les bactéries provenant des souris *ob/ob* contenaient plus de gènes codant pour des enzymes spécialisées dans la dégradation de polysaccharides non digestibles, par exemple des α -glucosidases, des α -galactosidases, β -galactosidases, et des pyruvates formate-lyases. Comparativement aux souris minces, la concentration des acides gras à chaînes courtes dans le contenu cæcal était plus élevée et la teneur en calories des fèces plus faible chez les souris obèses, ce qui suggère que l'extraction de l'énergie à partir de l'alimentation était plus élevée chez ces animaux.

Turnbaugh et coll. (Turnbaugh et al. 2008) ont ensuite montré chez des souris associées à un microbiote humain un régime de type occidental riche en lipides et en glucides induisait une augmentation du rapport cæcal *Firmicutes/Bacteroidetes*, qui devenait alors similaire à celui déterminé chez la souris *ob/ob*. Cependant, contrairement au modèle *ob/ob*, l'augmentation des *Firmicutes* était due à la prolifération d'un seul clade bactérien, *Erysipelotrichi*. Réciproquement, une modification des apports caloriques par restriction des glucides dans le régime occidental a entraîné une diminution des *Erysipelotrichi*. Une analyse métagénomique a révélé que le microbiote

de type régime occidental à teneur plus élevée en *Erysipelotrichi* était plus riche en gènes intervenant dans le métabolisme du fructose et du mannose, et dans les voies impliquant des phosphotransférases. Ces voies sont essentielles pour les bactéries pour qu'elles puissent importer et fermenter des sucres simples et les glycanes de l'hôte. La production d'AGCC due à la fermentation de ces glucides par les bactéries intestinales pourrait fournir une énergie additionnelle contribuant ensuite à l'accumulation de graisse corporelle chez la souris. Une autre étude réalisée sur souris à microbiote humain recevant un régime hyperlipidique a quant à elle montré un enrichissement de gènes impliqués dans le transport des sucres et des acides aminées (ABC transporteur) et dans les systèmes de phosphotransférases (PTS : Phosphotransférases system) également impliqués dans le transport des sucres (Turnbaugh, Ridaura, et al. 2009).

En 2013, Gordon et coll. ont transféré le microbiote de jumelles dont une seule des deux était obèse à des souris axéniques. Les souris receveuses ont alors exprimé le même phénotype que les jumelles donneuses : les souris ayant reçues le microbiote de la jumelle obèse sont devenues obèses tandis que les souris ayant reçues le microbiote de la jumelle mince sont restées minces. De plus, le microbiote issu de la jumelle mince, et notamment les bactéries de la famille des *Bacteroidetes* sont capables de supplanter celui de la jumelle obèse et de coloniser l'ensemble des souris. Ainsi, lorsque les souris étaient placées dans une même cage après le transfert des microbiotes des deux jumelles, l'ensemble des souris restaient minces suggérant que les bactéries colonisatrices peuvent protéger contre le développement de l'obésité (Ridaura et al. 2013) (Ridaura Science 2014).

Une étude récente a révélé le rôle fondamental de TLR-5, un récepteur de l'immunité innée, sur la structuration de la composition du microbiote intestinal et dans la pathogenèse du syndrome métabolique. Des souris TLR5^{-/-} développent une hyperphagie, et une obésité ainsi que les symptômes associés au syndrome métabolique comme l'hypertension, l'hypercholestérolémie et une insulino-résistance. Quand le microbiote de ces souris est transféré à des souris axéniques TLR5^{+/+}, les souris receveuses développent les mêmes symptômes du syndrome métabolique que les souris donneuses (Vijay-Kumar et al. 2010) (Vijay-Kumar M Science 2010). Dans une autre étude des souris TLR2^{-/-} développent une obésité, une insulino-résistance et une intolérance au glucose. Le microbiote de ces souris présente une plus grande proportion de *Firmicutes* et une plus faible proportion d'*Actinobacteria* du genre *Bifidobacterium* (Caricilli et al. 2011).

L'ensemble de ces données démontrent qu'il est possible de transmettre une plus ou moins grande susceptibilité au développement de l'obésité via le transfert de différents microbiotes ce qui renforce l'hypothèse selon laquelle le microbiote intestinal jouerait un rôle causal dans l'obésité.

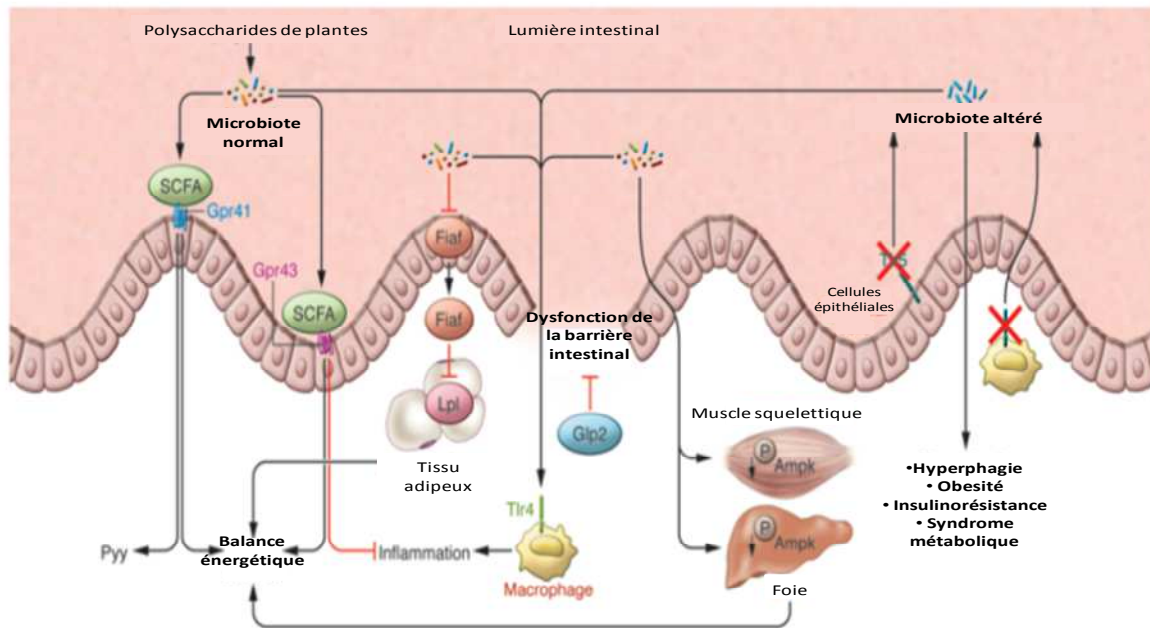


Figure 13: Le microbiote régule les fonctions métaboliques de l'hôte. Le microbiote contrôle la physiologie de l'hôte sur plusieurs niveaux. La fixation des AGCC (SCFA sur la figure) aux récepteurs GPR des cellules épithéliales intestinales (GPR41 et GPR43) participe au contrôle de la balance énergétique, en partie via l'hormone PYY. Cette interaction entre les AGCC et les GPR intervient également dans la régulation de la réponse inflammatoire de l'hôte. L'activation de TLR5 sur les cellules épithéliales (via la flagelline des bactéries par exemple) affecte la composition du microbiote intestinal : des souris $TLR5^{-/-}$ ont un microbiote intestinal altéré (Vijay-Kumar M Science. 2010) et développent une hyperphagie, une insulino-résistance, une obésité, une hypertension et une hyperlipidémie. Le microbiote intestinal inhibe la libération de FIAF des cellules épithéliales intestinales, ce qui a pour effet de lever l'inhibition de la LPL et de réguler ainsi le stockage des graisses. Grâce à un autre mécanisme encore inconnu à l'heure actuelle, le microbiote régule également la jauge d'énergie dans le foie et le muscle par la phosphorylation de l'AMPK. GLP2 modifie l'intégrité de la barrière épithéliale. Une altération de cette barrière déclenche l'activation des cellules myéloïdes en réponse aux signaux microbiens tels que des endotoxines se liant à TLR4. Fiaf, fasting-induced adipose factor; Glp2, glucagon-like peptide-2; Gpr41/43, G-protein coupled receptor; Lpl, lipoprotein lipase; Pyy, peptide YY; SCFA, short chain fatty acids. (D'après Tilg, Herbert The Journal of Clinical Investigation 2011).

3.5.2.c. Influence du microbiote dans les maladies métaboliques associées à l'obésité

Le développement de l'obésité s'associe à des dysfonctionnements métaboliques tels que la dyslipidémie (c'est-à-dire l'augmentation de la quantité de triglycérides plasmatiques et diminution de la quantité de cholestérol HDL plasmatique), l'augmentation de la glycémie à jeun ou encore l'augmentation de triglycérides hépatique. Ces dysfonctionnements métaboliques peuvent déboucher sur des pathologies dites « pathologies métaboliques », telles que le diabète de type 2 ou les pathologies hépatiques associées à l'obésité (Non Alcoholic Fatty Liver Disease).

Récemment, notre équipe a observé que le type de microbiote implanté influe non seulement sur le développement de l'obésité mais aussi sur les troubles métaboliques associés. Des souris conventionnelles ont été soumises à un régime hyperlipidique pendant 16 semaines :

certaines souris, mais pas toutes, ont développé des troubles métaboliques, fréquemment associés à l'obésité telles que la résistance à l'insuline ou la stéatose hépatique. Les souris ayant développé une hyperglycémie et possédant un fort taux plasmatique de cytokines pro-inflammatoires ont été nommées souris répondeuses (R), tandis que les souris non répondeuses (NR) affichent une glycémie normale et un état inflammatoire nettement moins marqué. Des souris axéniques ont alors été colonisées soit par le microbiote d'une souris répondeuse soit par le microbiote d'une souris non répondeuse et ont reçu un régime hyperlipidique pendant 16 semaines. Le groupe ayant reçu le microbiote de la souris répondeuse a développé une hyperglycémie et une hyperinsulinémie, signe d'un dysfonctionnement du métabolisme des sucres ainsi qu'une stéatose. Les souris ayant reçu le microbiote de la souris non répondeuse présentaient une glycémie normale et une stéatose beaucoup moins sévère (Le roy gut 2013). Les analyses de la composition du microbiote fécal des souris ont révélé que les genres *Barnesiella* et *Rosburia* sont plus fortement représentés chez les souris receveuse de la répondeuse et le genre *Allobaculum* est plus fortement représenté chez les souris ayant reçu le microbiote de la souris non-répondeuses. Par ailleurs, deux espèces : *Lachnospiraceae bacterium 609* et *Barnesiella intestinihominis* sont retrouvées en plus forte abondance chez les souris receveuses de la répondeuse et *Bacteroides vulgatus* est plus fortement représenté chez les souris receveuses de la non-répondeuses (Roy et al. 2012).

Le diabète de type 2 est une maladie métabolique dont la cause principale est une insulino-résistance associée à l'obésité. Une étude portant sur le microbiote fécal de 36 hommes adultes dont 18 patients diabétiques de type 2 a mis en évidence que la proportion de *Firmicutes* et notamment la classe des *Clostridia* est fortement diminuée chez les patients diabétiques comparativement au groupe contrôle (Larsen et al. 2010). Par ailleurs, le ratio *Bacteroidetes/Firmicutes* est positivement corrélé à la concentration plasmatique de glucose. Une autre étude a mis en évidence une diminution de l'espèce *Faecalibacterium prausnitzii* (*Firmicutes-clostridia*) chez des patients diabétiques (Furet et al. 2010). Enfin, une autre étude a mis en évidence une plus faible proportion de *Bifidobacterium* (*Actinobacteria*) et *Bacteroides vulgatus* au sein d'un groupe d'individus diabétiques comparativement au groupe contrôle (Wu et al. 2010). Fait intéressant, *Faecalibacterium prausnitzii* et *Bifidobacterium* sont corrélés à des effets anti-inflammatoires (Furet et al. 2010). Plus récemment, Vrieze et coll. ont montré qu'une infusion de microbiote intestinal d'un donneur sain à des receveurs présentant les symptômes du syndrome métabolique améliore leur sensibilité à l'insuline en six semaines (Vrieze et al. 2012).

Les interactions complexes entre le microbiote intestinal et le système immunitaire sont impliquées dans ces dysfonctionnements métaboliques associés à l'obésité (Cani & Delzenne 2009; Escobedo et al. 2014) et le rôle des réponses inflammatoires dans la pathogenèse des troubles métaboliques associés à l'obésité est de plus en plus reconnu et étudié.

3.5.3 Un mécanisme liant microbiote et obésité : l'hypothèse LPS

Des travaux récents ont montré que le microbiote intestinal pouvait initier l'état inflammatoire associé à l'obésité et à l'insulino-résistance par l'intermédiaire des lipopolysaccharides (LPS). En effet, la reconnaissance des LPS par le complexe CD14-TLR-4 (CD14) présent à la surface de cellules immunitaires peut déclencher des processus inflammatoires.

L'inflammation à bas bruit est une caractéristique commune de plusieurs désordres métaboliques associés à l'obésité (Everard, Sc, et al. 2013). En 2007, Cani et son équipe ont mis en évidence chez la souris que 4 semaines de régime hyperlipidique entraînaient une altération de la composition du microbiote (diminution des *Bifidobacteria spp* et des *Eubacteria spp*) et une multiplication par 2 à 3 de la concentration de LPS circulant. Ces résultats ont récemment été confirmés et il a également été montré qu'un régime hyperlipidique entraîne également une diminution de *Lactobacillus spp* et *Roseburia spp* (Dewulf et al. 2011). Cette augmentation de la concentration de LPS a été appelée "endotoxémie métabolique" étant donné que les concentrations mesurées restent bien en deçà de celles observées lors d'une endotoxémie associée à un choc septique. Lorsque l'endotoxémie métabolique était reproduite par une injection continue de LPS, les souris ont développé les mêmes anomalies métaboliques que celles induites par un régime hyperlipidique : prise de poids, diminution de la tolérance au glucose, augmentation du degré de stéatose, augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires dans le foie, les muscles et le tissu adipeux sous-cutané et viscéral. Parallèlement à cela, des souris dont le récepteur au LPS a été inactivé (CD14^{-/-}) se sont révélées résistantes à la fois aux effets d'un régime hyperlipidique et de l'injection de LPS. De plus, ces souris CD14^{-/-} se sont révélées hyper-sensibles à l'insuline quel que soit le régime, ce qui laisse penser que le récepteur CD14 influe sur la sensibilité à l'insuline y compris en conditions physiologiques. Dans une autre étude, les mêmes auteurs montrent qu'un traitement par antibiotiques diminue l'endotoxémie métabolique et la concentration caecale en LPS, ce qui a été associé à une amélioration des paramètres métaboliques à la fois chez des souris *ob/ob* et chez des souris sauvages recevant un régime hyperlipidique (Cani et al. 2008).

Le rôle du LPS dans l'initiation de l'inflammation systémique a aussi été évalué chez des humains sains. Une faible dose de LPS provoque une augmentation du niveau d'insulinorésistance et de la concentration de TNF- α et d'IL-6 dans le tissu adipeux (Anderson et al. 2007). De plus un repas riche en glucides et en lipides a pour conséquence une augmentation significative de la concentration de LPS, accompagnée d'une augmentation de l'expression de TLR-4 et de NF κ B par les leucocytes mononucléaires. Ces augmentations n'ont pas été observées après un repas riche en fibres et en fruits (Ghanim et al. 2009).

Le caractère pro-endotoxémique des lipides a été confirmé par une autre étude chez l'humain : la concentration de LPS plasmatique corrèle positivement avec l'apport total en énergie et en lipides sur trois jours (Amar et al. 2008). Dans un échantillon de 201 hommes en bonne santé, un repas riche en lipides augmente fortement l'endotoxémie, jusqu'à atteindre des concentrations plasmatiques suffisantes pour induire une réaction inflammatoire *in vitro* (sécrétion de TNF- α par des cellules endothéliales aortiques en culture) (Erridge et al. 2007).

Deopurkar et coll (Deopurkar et al. 2010) ont comparé l'effet chez des individus sains d'encas isocaloriques à base de crème et de sucre (riche en glucose et en acides gras saturés) ou de jus d'orange sur l'endotoxémie, les marqueurs de l'inflammation et du stress oxydatif. Seul l'encas à base de crème et de glucose a été suivi d'une augmentation de l'endotoxémie, de l'expression de TLR-4, NF κ B, SOCS3, TNF- α et IL-1.

Dans l'ensemble, ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'endotoxémie jouerait un rôle clef dans le développement de l'état inflammatoire associé à l'obésité et aux désordres métaboliques et que le niveau sanguin de LPS est affecté par la composition du régime alimentaire. Tous les nutriments n'ont pas la même capacité à augmenter l'endotoxémie. En effet,

il a été montré qu'un régime hyperlipidique réduisait l'expression de protéines constituant les jonctions serrées : les occludines et la ZO-1, ce qui a pour conséquence une augmentation de la perméabilité intestinale et de la concentration plasmatique en LPS.

L'obésité est également associée à une hyperactivité du système endocannabinoïde (eCB). L'accumulation de la graisse intra-abdominale est un des indicateurs de la dérégulation du système endocannabinoïde (Muccioli et al. 2010). Le système endocannabinoïde est également impliqué dans le maintien de la barrière intestinale. Ce système se compose de lipides endogènes qui exercent leurs fonctions en activant des GPCR : les récepteurs canabinoïdes 1 et 2 (CB₁ et CB₂) qui sont exprimés le long du tractus digestif (Alhouayek & Muccioli 2012). Les lipides endocannabinoïdes les plus étudiés sont l'anandamide (AEA) et le 2-arachidonoylglycerol (2-AG). Ces deux lipides sont des ligands des CB₁ et CB₂ et seraient impliqués dans la régulation des fonctions barrières de l'intestin (Alhouayek & Muccioli 2012; Alhouayek et al. 2011). Le système eCB altère la distribution des protéines de jonctions le long de l'épithélium (Muccioli et al. 2010). Le microbiote intestinal est un régulateur de CB₁ dans la mesure où l'administration d'antibiotiques diminue l'expression de ce gène chez la souris (Muccioli et al. 2010). Ces résultats suggèrent que, dans le cas de l'obésité, le microbiote intestinal, par le biais du système eCB, pourrait modifier l'intégrité de la barrière intestinale et activer l'endotoxémie métabolique qui en découle.

Les hormones gastro-intestinales que sont le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) et le glucagon-like peptide-2 (GLP-2), sécrétées par les cellules L de l'intestin, sont particulièrement impliquées dans les interactions hôte-microbiote et dans la physiopathologie de l'obésité. La modulation du microbiote par des prébiotiques améliore les fonctions barrières de l'intestin et diminue l'inflammation et l'insulinorésistance associées à l'obésité en favorisant la sécrétion de GLP-1 et GLP-2 (Cani & Delzenne 2011). Par ailleurs, un traitement par des antagonistes de GLP-2 associé à l'administration de prébiotiques chez des souris *ob/ob* empêche l'amélioration des fonctions barrières de l'intestin ainsi que la diminution de l'endotoxémie métabolique, ce qui suggère que GLP-2 est responsable de l'amélioration de la barrière intestinale induite par une modulation du microbiote dans le cadre de l'obésité (Cani et al. 2009).

3.5.4. Quelles bactéries responsables ?

A ce jour, il est impossible de définir quelles espèces bactériennes sont directement impliquées dans le développement de l'obésité et il est probable que ce soit la conjonction de nombreuses espèces au sein d'un écosystème qui puisse jouer ce rôle. Néanmoins quelques espèces bactériennes semblent à elles seules être capables d'induire ou au contraire de protéger de l'obésité. A titre d'exemple, des chercheurs de l'université de Shanghai ont isolé une bactérie candidate dans l'intestin d'un patient obèse. Implantée seule dans le tube digestif de souris axéniques, cette bactérie nommée *Enterobacter cloacae* B29, induit le développement de l'obésité des souris colonisées et soumises à un régime hyperlipidique (Fei & Zhao 2013). A l'inverse, Everard et coll. ont montré que l'espèce bactérienne *Akkermansia muciniphila* peut avoir un effet protecteur vis-à-vis de l'obésité. Cette bactérie, représente 3 à 5% du microbiote intestinal chez le sujet en bonne santé. Des souris conventionnelles soumises à un régime hyperlipidique ont une proportion plus faible d'*Akkermansia muciniphila* comparativement à des souris conventionnelles nourries avec un régime contrôle (Everard, Belzer, et al. 2013)(Everard pnas 2013). Un gavage oral de cette bactérie à des souris conventionnelles rendues obèses par une alimentation hyperlipidique entraîne une perte de masse grasse, associée à une amélioration de la sensibilité à l'insuline.

3.5.5 Intérêt potentiel des probiotiques dans le traitement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées

Les probiotiques sont définis par la FAO (Food and Agricultural Organization) comme des micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé, au-delà des effets nutritionnels traditionnels. Plusieurs études ont démontré que des souches probiotiques semblent favoriser la perte de poids et la réduction de l'adiposité viscérale, améliorer la tolérance au glucose et intervenir dans l'inflammation intestinale à bas bruit de l'individu. Ainsi, des souris nourries pendant 7 semaines avec un régime hyperlipidique supplémenté avec une souche de *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ont un taux de cholestérol, de triglycérides et de glucose plasmatique plus faible ainsi qu'une diminution de l'insulinorésistance et une amélioration de leur tolérance au glucose, comparativement aux mêmes souris nourries avec un régime hyperlipidique sans supplémentation (Cano et al. 2013). D'autres études expérimentales ont démontré des effets bénéfiques de l'administration de souches de *Lactobacillus* (Takemura et al. 2010; Wang et al. 2013; Kim et al. 2013). Des souris nourries pendant 13 semaines avec un régime hyperlipidique supplémenté avec une souche de *Lactobacillus rhamnosus* ont un gain de poids plus faible et une meilleure sensibilité à l'insuline comparativement aux mêmes souris nourries avec un régime hyperlipidique sans supplémentation. L'utilisation des *Lactobacilli* dans le contrôle de l'adiposité fait cependant débat (Delzenne et al. 2011; Ehrlich 2009) (; Ehrlich, S. D. Nat. Rev. Microbiol 2009). En effet, le genre *Lactobacillus* comprend plus de 90 espèces et d'autres études sont nécessaires afin de distinguer les espèces ou les souches intéressantes permettant un contrôle de l'adiposité.

Malgré des résultats prometteurs les démonstrations de l'efficacité des probiotiques dans le traitement de l'obésité sont encore faibles, et l'utilisation thérapeutique de probiotiques dans le traitement des désordres métaboliques n'est pas encore conseillée (Floch et al. 2011).

3.5.6 Intérêt potentiel des prébiotiques dans le traitement de l'obésité et des pathologies métaboliques associées

Les prébiotiques sont définis comme des composés ayant un effet bénéfique sur la santé de l'hôte via la stimulation des activités et/ou de la croissance de bactéries spécifiques (Roberfroid et al. 2010)(Roberfroid M Br J Nutr 2010). Il s'agit essentiellement de fibres végétales de composition en oses particulière, comme les fructanes (inuline), les fructo-oligosaccharides, les galacto-oligosaccharides, les trans-galacto-oligosaccharides (TOS), les xylo-oligosaccharides (XOS), le lactulose, etc. Ils ne sont pas digérés ni absorbés au niveau de l'intestin grêle et sont utilisés comme substrats sélectifs de phyla/genres/espèces de bactéries capables de les métaboliser. Les prébiotiques peuvent ainsi contribuer au développement de *Bifidobacteria* (Neyrinck et al. 2011)(, Parnell JA Br J Nutr 2012), de *Bacteroides* (Everard et al. 2011), de *Prevotella* et de *Roseburia* (Neyrinck et al. 2011). La supplémentation d'inuline sur un régime hyperlipidique favorise une augmentation du nombre de *Bifidobacterium spp.* au sein du microbiote intestinal de souris (Dewulf et al. 2011). De façon intéressante, le nombre de *Bifidobacterium spp.* est inversement corrélé avec le développement de la masse grasse, l'intolérance au glucose et le taux de LPS (Cani et al. 2007). De plus les prébiotiques permettent également une diminution de l'inflammation intestinale à bas bruit en améliorant le maintien de la barrière intestinale (Cani et al. 2009) et en diminuant la sécrétion de cytokines proinflammatoires, ce qui aboutit à une plus grande tolérance au glucose et une plus grande sensibilité à l'insuline (Everard et al. 2011). Lors d'une étude réalisée dans notre laboratoire sur des souris à microbiote humain, il a été montré que l'ajout de FOS à un régime hyperlipidique réduit l'accumulation de tissu adipeux au niveau épидidymal et inguinal. Cet effet était associé à une stimulation significative du groupe *Clostridium coccoides* et des bifidobactéries et à une répression du groupe *Clostridium leptum* (Respondek et al. 2013).

Le traitement de sujets obèses ou diabétiques par des prébiotiques a été testé dans quelques études, peu nombreuses à ce jour. Une perte de poids partielle a pu être observée avec les prébiotiques chez des patients obèses ou en surpoids (Parnell & Reimer 2009). Cependant, la quantité de preuves est à l'heure actuelle encore limitée, et des recherches supplémentaires sont nécessaires pour définir la relation entre la consommation de différents prébiotiques et l'amélioration de la santé humaine et des perturbations métaboliques.

3.5.7 Effets des antibiotiques

Les antibiotiques sont prescrits afin d'éliminer ou d'empêcher une colonisation bactérienne dans le corps humain et peuvent influencer la composition du microbiote intestinal jusqu'à 2 ans après leur administration (Jernberg et al. 2010). La diminution de la quantité de bactéries intestinales après l'utilisation d'antibiotiques provoque des altérations dans plusieurs voies métaboliques bactériennes. Une étude sur la souris *ob/ob* a montré que l'ampicilline et la

norfloxacin provoque une réduction de la stéatose hépatique, de la production de triglycérides hépatique parallèlement à une amélioration de la sensibilité au glucose et de la sensibilité à l'insuline (Membrez et al. 2008). Cani et coll. ont montré que les antibiotiques engendraient une diminution du taux de LPS, améliorant ainsi les désordres métaboliques associées à l'endotoxémie. L'intolérance au glucose, le gain de poids et la masse grasse étaient également diminuées (Cani et al. 2008). Cependant, certaines études mettent en avant le rôle des antibiotiques dans le développement de l'obésité. Ainsi, une exposition précoce à des antibiotiques serait associée au développement du surpoids chez l'enfant (Ajslev et al. 2011).

Les mécanismes associant antibiotiques et développement ou réduction de l'obésité restent peu connus à l'heure actuelle. Par ailleurs, à une époque où émergent de plus en plus de pathogènes multirésistants, la prescription d'antibiotiques chez l'adulte dans le traitement de l'obésité doit être soigneusement évaluée.

4. Les techniques d'analyses du microbiote

4.1. Les techniques basées sur la culture

Initialement la composition du microbiote était analysée en employant des techniques de culture utilisant différents milieux afin de sélectionner différentes populations de bactéries selon leurs besoins nutritifs (Balch et al. 1979; Finegold et al. 1974). Ces techniques avaient l'avantage certain de leur faible coût et de leur reproductibilité. Leur principale limitation résidait dans leur capacité de distinguer différents groupes phylogénétiques. De plus, elles ne permettaient pas de fournir une vision d'ensemble des microorganismes en présence. Enfin, le criblage d'espèces ou de souches était extrêmement difficile, voir impossible (Cani 2013). L'étude d'un écosystème microbien complexe tel que celui de l'intestin est d'autant plus difficile que la majorité des espèces en présence sont anaérobies strictes et on estime que plus de 70% du microbiote intestinal n'est pas cultivable avec les méthodes actuelles (Eckburg et al. 2005). L'avancée des techniques d'analyses moléculaires a conduit les microbiologistes à abandonner petit à petit les techniques dépendantes de la culture pour étudier le microbiote intestinal.

4.2. Les techniques indépendantes de la culture

4.2.1. L'ARN ribosomal 16S

Les microbiologistes se sont tournés vers les techniques moléculaires utilisées en écologie microbienne qui permettent la caractérisation de communautés complexes telles que les écosystèmes microbiens marins ou du sol (Giovannoni et al. 1990; Jurgens et al. 1997). Ces techniques utilisent le gène codant pour la sous-unité 16S de l'ARN ribosomal comme marqueur de la diversité génétique des communautés. Ce gène a l'avantage d'être raisonnablement petit ($\approx 1,5$ kb) et représente un bon compromis entre conservation et variabilité qui permet de faire la distinction entre espèces issues de différents groupes phylogénétiques (Peterson et al. 2008). Quelques techniques peuvent être citées en exemple (Figure 14) telles que l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) (Rigottier-Gois et al. 2003), les techniques d'empreinte telles que l'électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE) (Ben-Amor et al. 2005), l'électrophorèse sur gel en gradient de température (TGGE) (Zoetendal et al. 1998), le polymorphisme de longueur des fragments de restriction terminaux (T-RFLP) (Liu et al. 1997), les micro-puces ADN (DNA microarrays) (Palmer et al. 2006), les réactions en chaîne quantitative par polymérase (qPCR) (Mariat et al. 2009) ou encore le séquençage du gène codant l'ARNr 16S (Peris-Bondia et al. 2011).

Bien que ces techniques restent très utilisées afin de décrypter les liens entre la composition phylogénétique du microbiote intestinal d'une part et certaines pathologies d'autre part, les liens de causalité entre les deux ne sont pas toujours évidents du fait que les profils taxonomiques ne sont pas facilement traduisibles en fonctions métaboliques (Cani 2013).

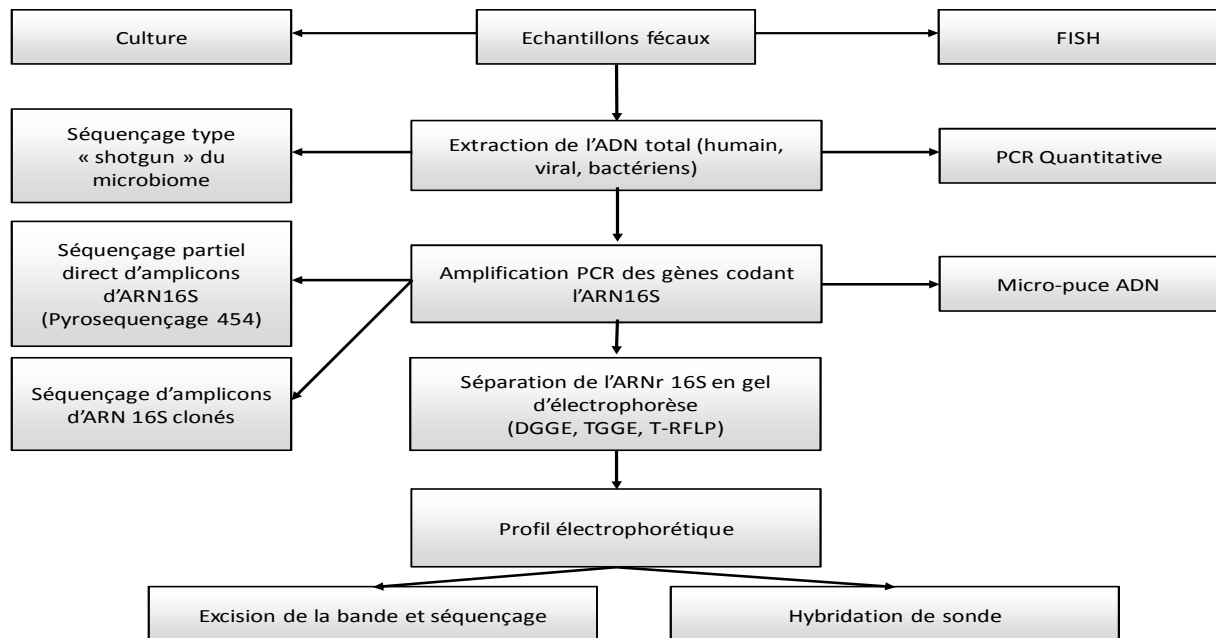


Figure 14 : Vue d'ensemble des différentes techniques utilisées afin de caractériser le microbiote intestinal. (D'après Fraher Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol 2012).

4.2.2. L'hybridation *in situ* en fluorescence

L'hybridation *in situ* en fluorescence utilise des sondes oligonucléotidiques couplées à un marqueur fluorescent qui s'hybrident à des séquences d'ARNr 16S complémentaires spécifiques d'une espèce ou d'un groupe bactérien. La combinaison de l'hybridation *in situ* en fluorescence et de la cytométrie en flux est utilisée depuis longtemps dans l'étude des populations microbiennes (Amann et al. 1990) et plus particulièrement du microbiote intestinal (Rigottier-Gois et al. 2003). C'est une technique semi-quantitative qui a l'avantage d'être rapide et qui peut être réalisée directement sur des échantillons frais, évitant ainsi des biais dus aux traitements des échantillons avant analyse. Cependant cette technique nécessite de connaître la séquence de l'ARNr 16S des bactéries ciblées et ne peut donc pas être utilisée dans le but de détecter de nouvelles espèces de bactéries (Tableau 1).

4.2.3. Les techniques d'empreintes

Les techniques d'empreintes (fingerprinting) sont un ensemble de procédés qui génèrent un profil ADN microbien constitué par les différents fragments d'ADN bactériens de chaque échantillon et permet ainsi la comparaison de différentes communautés microbiennes présentes dans différents échantillons. Les gènes codant les ARNr 16S sont amplifiés puis séparés par une électrophorèse sur gel en gradient de température (TTGE) ou par une électrophorèse sur gel en gradient dénaturant (DGGE). Les bandes d'intérêts peuvent être prélevées et ensuite séquencées. Les techniques d'empreintes permettent d'identifier les phylotypes les plus abondants et permettent des comparaisons rapides entre des individus malades et des individus en bonne santé (Noor et al. 2010). Cependant cette technique ne permet pas de fournir une identification phylogénétique directe (Tableau 1) ni d'avoir accès au phylotypes sous-dominants du microbiote intestinal.

4.2.4. Les micro-puces à ADN

La technologie des micro-puces à ADN est une technologie haut-débit qui permet l'identification phylogénétique des bactéries du microbiote intestinal (Everard et al. 2011; Geurts et al. 2011). Cette technique permet d'utiliser des amplicons d'ARNr 16S ou bien de l'ADN extrait de fèces. Les sondes oligonucléotidiques sont fixées sur une lame de verre. L'addition des molécules d'ADN (ou d'ARN 16S) fluoromarkées complémentaires de ces sondes permet l'hybridation. La fluorescence qui résulte de la réaction d'hybridation est alors détectée par un laser. C'est une technique rapide, semi quantitative qui permet la détection de plusieurs espèces simultanément. Cependant, il existe des phénomènes d'hybridations croisées (c'est-à-dire des hybridations de plusieurs sondes sur une même cible) et la détection des espèces est limitée par les sondes placées sur la puce (Tableau 1).

4.2.5. La PCR quantitative

La PCR quantitative est une technique utilisée pour quantifier des bactéries ou un groupe bactérien spécifique par amplification de séquences d'ADNr 16S spécifiques d'espèces bactériennes (ou d'un groupe bactérien) (Sokol et al. 2009) en utilisant des amorces complémentaires fluoromarkées. Cette technique permet de quantifier les quantités d'ADNr 16S cibles présents dans l'échantillon en utilisant une courbe standard issue d'amplifications parallèles d'un nombre de copies connues. L'intensité du signal est proportionnelle à la quantité d'ADNr 16S cible présent dans l'échantillon. L'inconvénient de cette technique réside dans le fait que la PCR quantitative est axée sur des groupes bactériens connus au départ, et ne peut donc pas identifier de nouvelles espèces bactériennes. Cependant, cette technique présente l'avantage d'être précise et rapide (Tableau 1).

4.2.6 Le séquençage de l'ADNr 16S

Le séquençage est à l'heure actuelle une méthode de référence dans l'identification taxonomique des espèces bactériennes. La méthode de séquençage de Sanger sur des amplicons clonés d'ADNr 16S a été une des premières méthodes utilisées. Cette approche a permis de démontrer qu'il existe une variabilité individuelle du microbiote intestinal (Eckburg et al. 2005). Cependant, cette méthode reste fastidieuse (beaucoup de clones générés), et a peu à peu laissé sa place aux techniques de séquençage dites de « nouvelle génération » telles que le pyroséquençage 454, les méthodes Illumina ou SOLiD. Ces méthodes à haut débit permettent le séquençage d'amplicons d'ADNr 16S sans passer par une étape de clonage, et permettent également le séquençage parallèle de beaucoup d'échantillons dans un même temps. Elles possèdent également l'avantage d'être rapides et de permettre l'identification phylogénétique, la détection et l'identification de nouvelles espèces bactériennes (Tableau 1). Ainsi, le pyroséquençage par exemple, a été utilisé pour comparer les microbiomes d'individus minces et obèses (Turnbaugh, Hamady, et al. 2009) ou encore pour comparer les microbiomes de patients atteints du syndrome de l'intestin irritable et de contrôles sains (Ian B Jeffery et al. 2012). Ces techniques requièrent néanmoins des analyses informatiques poussées. En effet, afin de déterminer la composition bactérienne, les ADNr 16S séquencés sont assemblés en Unités Taxonomiques Opérationnelles (OTUs ou Operational Taxonomic Unit) basées sur leur pourcentage d'identité de séquence. Ce pourcentage est utilisé afin de déterminer les niveaux taxonomiques : Des OTUs contenant des séquences avec plus de 99% d'identité sont des taxa de niveau souche. Des OTUs contenant plus de 97% d'identité sont considérés comme étant de la même espèce. Des OTUS d'espèces différentes mais appartenant au même genre ont des identités de séquence supérieures à 95%. Enfin des OTUs avec plus de 90% d'identité correspondent au niveau taxonomique de la famille (Peterson et al. 2008).

Il est important de noter que les techniques nécessitant l'extraction d'ADN et utilisant l'amplification par PCR (c'est à dire les techniques d'empreintes, les micropuces ADN, la qPCR et le séquençage) présentent d'autres limitations. Chaque étape d'extraction et de traitement de l'ADN est une source potentielle de biais. De plus, les techniques d'amplifications PCR sont aussi une source de biais puisque le gène cible n'est pas amplifié avec la même efficacité chez les différentes espèces en présence.

4.2.7 La Métagénomique par séquençage de type « shotgun »

La métagénomique représente l'avancée la plus récente dans le développement de l'analyse du microbiote intestinal. C'est aujourd'hui la méthode la plus puissante pour analyser les fonctions métaboliques potentielles du microbiote intestinal en plus de sa composition. Cette approche requiert le séquençage de l'ensemble de l'ADN de la communauté microbienne par fragmentation aléatoire des molécules d'ADN (séquençage type shotgun), le séquençage de ces fragments et la reconstruction par chevauchement afin de les assembler en une séquence continue (Fraher et al. 2012). Cette approche permet d'identifier les contributions fonctionnelles et les rôles biologiques de cette communauté complexe. Les informations ainsi obtenues permettent d'établir des corrélations entre le microbiote intestinal et des états pathologiques (De Vos 2009; Le Chatelier et al. 2013). Par ailleurs, cette méthode ne dépend pas du clonage ou du séquençage de gènes particuliers mais fournit une vue détaillée de l'ensemble des gènes qui existe

au sein d'une communauté donnant ainsi un aperçu de la structure (composition) et des fonctions associées dans un même processus expérimental. Néanmoins la métagénomique sur le microbiote fécal ne permet pas de visualiser les interactions moléculaires importantes qui se déroulent dans le tractus digestif. De plus cette approche reste chère et génère une grande quantité de données et nécessite des analyses informatiques élaborées (Tableau 1).

Technique	Description	Avantages	Inconvénients
Culture	Isolement des bactéries sur milieu sélectif	Pas cher, semi quantitatif	Fastidieux moins de 30% du microbiote intestinal est cultivable
FISH	Sondes oligonucléotidiques couplées à des marqueurs fluorescents et s'hybrident sur des séquences complémentaires de l'ARNr 16S. Quand l'hybridation se produit les événements de fluorescence peuvent-être comptés et triés en utilisant la cytométrie en flux.	Identification phylogénétique, semi-quantitatif, pas de biais de PCR	L'identification phylogénétique dépend de la séquence des sondes, impossible d'identifier de nouvelles bactéries
DGGE/TGGE	Séparation sur gel d'amplicons d'ADNr 16S en utilisant un gradient dénaturant (chimique ou température).	Rapide, semi-quantitatif, les bandes de gel peuvent être prélevées pour des analyses ultérieures	Pas d'identification phylogénétique directe, biais de PCR, pas d'accès aux phylotypes sous dominants du microbiote
Micropuce ADN	Des sondes oligonucléotidiques couplées à des marqueurs fluorescents s'hybrident à des séquences nucléotidiques complémentaires. La fluorescence est détectée par laser.	Identification phylogénétique, rapide, semi-quantitatif	Hybridations croisées, biais de PCR, les espèces présentes en faible quantité peuvent être difficile à détecter
qPCR	Amplification et quantification de l'ADNr 16S. Le mélange réactionnel contient un composé fluoromarké permettant la quantification.	Identification phylogénétique, quantitatif, rapide	Biais de PCR, impossibilité d'identifier de nouvelles espèces
Séquençage direct d'amplicons de gènes codant l'ARN16S	Séquençages parallèle massif partiel d'amplicons d'ADNr 16S. Dans le cas du pyroséquençage 454 les amplicons sont fixés sur des billes, amplifiés par pcr en émulsion. L'addition de luciférase au milieu réactionnel permet la détection d'un signal électroluminescent qui est lu par un pyrogramme.	Identification phylogénétique, quantitatif, rapide, identification de bactéries inconnues	Biais de PCR, fastidieux
Séquençage du microbiome (shotgun)	Séquençage parallèle massif de l'ensemble du microbiome intestinal (Pyroséquençage 454, Illumina, SOLID)	Identification phylogénétique, quantitatif, Identification des fonctions des gènes du microbiote de l'échantillon	Cher, l'analyse informatique des données est complexe, les fonction des gènes ne sont pas toujours connus

Tableau 1 : Techniques utilisées pour caractériser le microbiote intestinal. (D'après Fraher Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol 2012).

La métagénomique est un outil très puissant permettant la description du potentiel génétique des micro-organismes présents dans un environnement défini, mais ne permet pas un suivi de leur activité ou de leurs expressions géniques. Ainsi, d'autres approches permettent d'évaluer les fonctions réellement exprimées par le microbiote intestinal (Tableau 2). Les approches de métatranscriptomique et métaprotéomique permettent ainsi de déterminer les ARNm ou les protéines exprimées par le microbiote intestinal (Tableau 2).

4.2.8 La métatranscriptomique

La métatranscriptomique consiste à extraire et analyser les séquences d'ARNm d'une communauté microbienne afin de caractériser les profils d'expression génique qui en découle. Cette approche permet ainsi d'obtenir des informations phylogénétiques de même que la connaissance des fonctions exprimées par cette communauté. A l'heure actuelle, peu d'études métatranscriptomiques se sont focalisées sur le microbiote intestinal. Des puces à ADN ont par exemple été utilisées afin d'étudier l'activité de certaines bactéries au sein du tractus digestif (Mahowald et al. 2009; Klaassens et al. 2009). Plus récemment, Gosalbes et coll. ont analysé le métatranscriptome fécal de 10 individus en bonne santé (Gosalbes et al. 2011). Cette technique présente encore des limitations dues en partie au fait que le nombre de copies d'ARN transcrit est très variable selon le gène considéré, ce qui peut évidemment biaiser le calcul de l'abondance relative. D'autre part, la présence d'un transcrit ne veut pas dire que ce dernier sera nécessairement responsable de la synthèse d'une protéine fonctionnelle dans le milieu. Par ailleurs, le temps de demi-vie de l'ARNm est relativement court et que l'ARNm ne représente qu'une petite fraction de l'ARN total extrait (comparativement aux ARNr et aux ARNt) (Stewart et al. 2010; Van Vliet 2010).


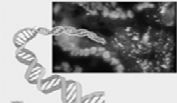

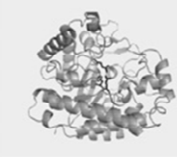
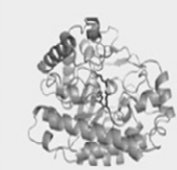
Meta-omiques		Molécule(s) cible(s)	Connaissances apportées	Limites	Implications cliniques
Phylogénie		ADNr 16S	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Composition bactérienne & diversité 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas d'informations sur les fonctions bactériennes 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Composition du microbiote dans la dysbiose ➤ Espèces spécifiques de pathologies
Métagénomique		ADN génomique bactérien	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Profil microbiens de haute résolution ➤ Contenu en gènes des bactéries non-cultivables 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Pas d'informations sur les fonctions réelles du microbiote 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dysbiose fonctionnelle ➤ Gènes microbiens spécifiques de pathologies ➤ Vers un diagnostic médical basé sur des analyses fonctionnelles
Métatranscriptomique		ARNm/ADNc	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Profil d'expressions de gènes de haute résolution ➤ Expression génique microbienne selon différentes conditions physiologique/environnementales 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Faible stabilité des ARNm bactériens ➤ Représentativité inconnue / Plusieurs étapes de purification nécessaires ➤ Pas de protocole unique 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Dysbiose fonctionnelle ➤ Activité cinétique microbienne ➤ Expression de gènes à un (des) temps et à un environnement donné(s). ➤ Suivi spécifique des bactéries actives
Métabolomique		Protéines/Peptides	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Profil et mapping de protéines de haute résolution ➤ Production différentielle de protéines selon différentes conditions physiologiques/environnementales 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Bases de données protéiques très incomplètes ➤ Stabilité hétérogène ➤ Pas de protocole unique 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Confirmation des fonctions: amélioration de l'annotation des génomes ➤ Identification des analogues eucaryotes-procaryotes ➤ Biomarqueurs
Métabolomique		Métabolites	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Profil métabolique de l'hôte et de son microbiote ➤ Facile à réaliser et ne nécessite que de faibles quantités de matériel biologique (plasma/fèces/urine) 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Beaucoup de métabolites inconnus dans les bases de données ➤ Pas de protocole unique ➤ Combinaison des molécules du microbiote et des molécules de l'hôte 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Nouvelles voies confirmées ou identifiées ➤ Criblage à haut débit de biomarqueurs métabolique ➤ Transfert facile vers les paramètres cliniques

Tableau 2 : Les différentes analyses méta-omiques. Les différents niveaux d'analyses sont représentés de la phylogénie jusqu'à la métabolomique.

4.2.9 La métaprotéomique

Contrairement à l'ADN ou l'ARN, les protéines ont l'avantage de ne pas refléter seulement des fonctions potentielles mais réelles. Elles sont en effet responsables du phénotype de l'organisme étudié et représentent donc de bons marqueurs biologiques des cycles métaboliques susceptibles de se produire dans un milieu donné (Klaassens et al. 2007). Une approche couramment utilisée consiste à séparer les protéines à étudier par une électrophorèse à 2 dimensions, suivie d'une digestion enzymatique et une ionisation avant identification par spectrométrie de masse et par comparaison à des bases de données de référence. Les étapes de séparation des protéines peuvent être modifiées de manière à sélectionner les protéines de l'hôte qui interagissent avec des protéines microbiennes spécifiques, permettant d'obtenir un aperçu sur les interactions intervenant dans le maintien de la symbiose hôte-microbiote (Sekirot et al. 2010). Les limitations associées à ce type d'analyse résident dans l'efficacité des protocoles d'extraction et de purification qui doivent prendre en compte la localisation des protéines à extraire, ces dernières pouvant être secrétées de façon intra- ou extracellulaire, ou encore être liées à des particules minérales ou organiques (Benndorf et al. 2007). De plus, contrairement aux acides nucléiques, les protéines ne peuvent être amplifiées, si bien que le faible taux de copies de certaines protéines ne peut être compensé (Keller & Hettich 2009).

4.2.10 La métabolomique

La métabolomique correspond au criblage non sélectif des liquides biologiques afin de révéler et de distinguer les métabolites issus du microbiote et ceux issus du métabolisme de l'hôte. Les métabolites sont définis comme l'ensemble des molécules de poids moléculaire inférieur à 1500 Daltons et jouent un rôle très important dans les nombreuses voies qui relient les différents composés actifs d'une cellule ou d'un organe. La teneur des métabolites présents dans un système biologique fournit ainsi une information sur le niveau ultime de l'expression génique tout en incluant la contribution des apports exogènes via l'alimentation et les interactions entre le microbiote intestinal et son hôte. À la manière de la protéomique, une analyse métabolomique requiert l'intervention de plusieurs outils, à commencer par une technique de séparation telle que la chromatographie gazeuse ou liquide, ou encore l'électrophorèse par capillaires, suivie d'une étape de spectrométrie de masse. Le recours à la résonance magnétique nucléaire (RMN) couplée à la spectroscopie est également possible et présente l'avantage d'être une approche mieux reproductible que celle utilisant la spectrométrie, par contre cette dernière est réputée pour être plus sensible.

Les métabolites ont la particularité d'être très hétéroclites en termes de composition et de propriétés physiques et chimiques, d'où l'importance de veiller à employer des outils adéquats pour identifier le plus grand nombre de molécules possibles afin de caractériser le métabolome d'une communauté microbienne. Les informations obtenues par métabolomique ont ainsi permis de caractériser l'impact du microbiote intestinal murin sur le métabolisme de l'hôte (Wikoff et al. 2009). Une des difficultés de cette approche réside dans la grande diversité des métabolites qui ne peuvent être déduits du génome. Par ailleurs, une des principales limites à

la reconstitution de réseaux métaboliques en employant cette approche reste le manque de banques de données métabolomiques qui empêche l'identification structurale de nouveaux métabolites qui n'ont pas déjà été caractérisés (Cabellos-Ruiz et al. 2010). Enfin, il existe également des problèmes de reproductibilité et de standardisation inter-plateformes.

5. Objectifs du projet de thèse

Au cours des dernières années, de nombreuses études ont porté sur les relations entre le microbiote intestinal et l'obésité. Des groupes bactériens ont été incriminés et des hypothèses proposées mais les mécanismes liant microbiote et obésité restent en grande partie inconnus.

Le microbiote intestinal est constitué de plusieurs centaines d'espèces et est spécifique de chaque individu. Récemment, il a été révélé l'implication potentielle de ce microbiote dans le développement de l'obésité. Lors d'une étude précédente, notre équipe a ainsi montré que les souris sans germes (dites « axéniques ») sont résistantes à l'obésité et aux désordres métaboliques induits par un régime hypercalorique (Roy et al. 2012). Par ailleurs, nous avons observé que certaines souris conventionnelles soumises à un tel régime développent une obésité et une insulino-résistance importantes (phénotype dit répondeur) tandis que d'autres restent minces et tolérantes au glucose (phénotype dit non répondeur) indépendamment de la quantité de nourriture consommée. Les mécanismes expliquant cette hétérogénéité de phénotype sont actuellement peu connus.

Ce projet de thèse vise donc à élucider les mécanismes liant le microbiote intestinal au développement de l'obésité et des désordres associés en partant du principe que l'hétérogénéité (en termes de composition et de fonctions) du microbiote intestinal, spécifique de chaque individu (aussi bien chez l'homme que chez le rongeur), joue un rôle dans ces réponses différentes à un même régime hypercalorique. Pour ce faire, des souris conventionnelles ont reçu un régime contrôle ou un régime hyperlipidique pendant 12 semaines. A l'issue de ce régime, des souris ont été sélectionnées en tant que répondeuses ou non-répondeuses.

Une approche par métagénomique à partir d'échantillons fécaux prélevés avant et après régime hyperlipidique et issus des souris répondeuses et non-répondeuses ont été analysés. Les profils de microbiotes avant et après régime hyperlipidique ont été comparés afin de déterminer les effets de ce régime sur le microbiote intestinal. De plus, le profil du microbiote des souris répondeuses a été comparé à celui des souris non-répondeuses afin de détecter des espèces bactériennes, des gènes ou des voies métaboliques sous- ou sur-représentés dans les deux phénotypes. Par ailleurs, des échantillons de fèces, d'urine et de plasma prélevés avant et après le régime hyperlipidique ont été analysés par métabolomique et nous avons ainsi analysé les fluctuations métaboliques induites par l'effet du régime.

L'ensemble de ces travaux a eu pour but d'identifier s'il existe un microbiote de prédisposition au développement ou à la résistance du développement d'une obésité induite. Au cours de ce projet de thèse nous avons utilisé l'approche de métagénomique à partir d'échantillon fécaux afin d'identifier les profils du microbiote intestinal des souris NR et des souris R avant et après régime hyperlipidique en vue de mesurer l'impact de ce type de régime sur le microbiote, et surtout de détecter les espèces bactériennes, les gènes ou les voies métaboliques potentiellement sous- ou sur-représentés dans les deux phénotypes. D'autre part, l'approche de métabolomique a été utilisée sur des échantillons d'urine, de fèces et de plasma avant et après régime afin de visualiser les fluctuations métaboliques induites par l'effet du régime d'une part et d'identifier les métabolites (biomarqueurs) associés à chacun des phénotypes d'autre part.

1. Expérimentation animale

L'expérimentation animale a été effectuée au sein de l'unité expérimentale UE0907 IERP « Infectiologie Expérimentale des Rongeurs et Poissons » de l'INRA de Jouy-en-Josas.

60 souris mâles conventionnelles C57BL/6J ont été commandées auprès de Charles River Laboratories¹⁴ (Saint Germain sur l'Arbresle, France). Les souris âgées de quatre semaines à leur arrivée, ont été allotées par 10 pendant quatre jours. Au bout de quatre jours, les souris ont alors été mises en cages individuelles. Pendant les deux premières semaines en cages individuelles, les animaux ont reçu un régime contrôle R03-40 de chez Safe-diet¹⁵ et de l'eau *ad libitum*. Au bout de deux semaines, 50 souris choisies aléatoirement ont débuté un régime hyperlipidique D12492 (Figure 16) provenant de chez Research-Diet¹⁶ (Nouveau-Brunswick, Canada) pendant 12 semaines tandis que 10 souris ont continué de recevoir le régime contrôle R03-40 (Figure 16). Les compositions lipidiques de chaque régime sont détaillées dans la Figure 15 et le Tableau 3.

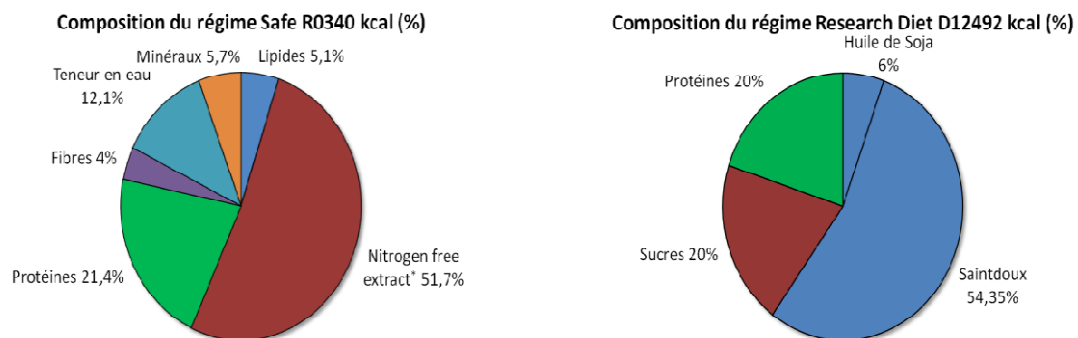


Figure 15 : Composition du régime contrôle et du régime hyperlipidique. Energie totale du régime R0340 (contrôle) : 2830 kcal/kg. Energie totale du régime D12492 (hyperlipidique) : 4057 kcal/kg. *Le NFE (Nitrogen Free Extract) est constitué par les glucides, les amidons et l'hémicellulose des aliments.

	Composition lipidique huile de soja pour 100g (%)	Composition saintdoux pour 100g (%)	Composition lipidique régime contrôle pour 100g (%)
Acide palmitique C16:0 (saturé)	10,46	23,8	16
Acide stéarique C18:0 (saturé)	4,45	13,5	3,16
Acide linoléique C18:2 ω-6 (poly-insaturé)	50,95	10,2	52,74
Acide oléique C18:1 cis-9 (mono-insaturé)	22,55	41,2	21,15
Acide α-linolénique C18:3 ω-3 (poly-insaturé)	6,8	1	5,9
Acide érucastique (mono-insaturé) ω9	0,23	1	-
Acide myristique C14:0 (saturé)	-	1,3	-
Acide laurique C12:0 (saturé)	-	0,2	-
Acide caprique C10:0 (saturé)	-	0,1	-
Acide palmitoléique C16:1 cis-9 (mono-insaturé)	-	-	1,05

Tableau 3 : Composition lipidique des différents régimes.

¹⁴ <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/c57bl-6n-mouse>

¹⁵ <http://www.safe-diets.com/eng/High/produits/diets/13514/ds-a03.pdf>

¹⁶ <http://www.researchdiets.com/open-source-diets/stock-diets/dio-series-diets>

Au cours de cette expérimentation, des prélèvements de sang, d'urine et de fèces ont été effectués 1 semaine avant (s-1), une semaine après (s+1), 6 semaines après (s+6) et 12 semaines après le début du régime hyperlipidique (s+12). Par ailleurs, un test de tolérance au glucose a été réalisé 9 semaines après le début du régime hyperlipidique (s+9). Les animaux ont été pesés chaque semaine et leur consommation alimentaire a également été évaluée durant cette expérimentation (Figure 16). Par la suite, dans ce manuscrit, les souris contrôles sont dénommées « souris contrôles » ou « CONT », les souris sous régime hyperlipidique (high fat) sont dénommées « souris High Fat » ou « HF », les souris non répondeuses sont dénommées « souris NR » et les souris répondeuses sont dénommées « souris R ».

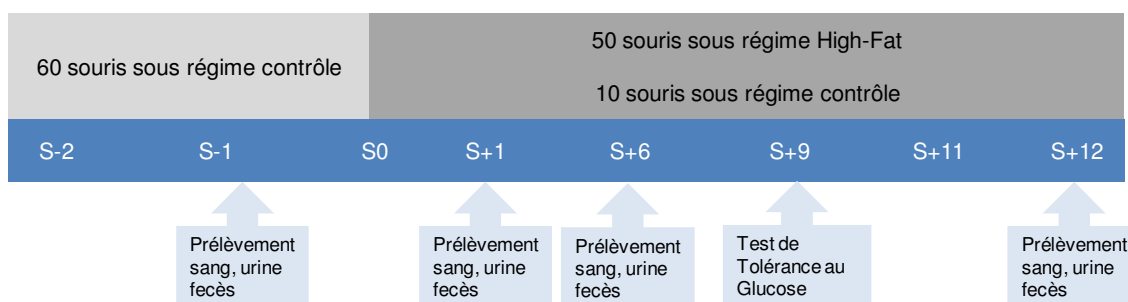


Figure 16 : Diagramme de l'expérimentation animale.

12 semaines après le début du régime hyperlipidique, les souris ont été anesthésiées avec l'agent gazeux isoflurane (Aerrane, Baxter, Maurepas, France). Les procédures d'euthanasie ont été faites en accord avec les recommandations Européennes de la santé et de l'utilisation des animaux de laboratoires et avec l'autorisation 78-60 des services vétérinaires Français.

Pour chacune des souris, le foie, ainsi que les tissus adipeux épидидymal et inguinal ont été prélevés et pesés. Le caecum a été prélevé, pesé vide et plein. L'iléon et le côlon ont également été prélevés et la muqueuse de chacun de ces tissus a été détachée et prélevée. Le muscle gastrocnémien a été prélevé uniquement sur les souris soumises au régime hyperlipidique. Suivant les analyses prévues, l'ensemble de ces tissus a été conditionné de manière différente. De ce fait, une partie du foie, du tissu adipeux épидидymal, du tissu adipeux inguinal, de l'iléon, du côlon et du muscle gastrocnémien ont été plongés dans 100 µl d'une solution de RNA Later®, en vue des extractions d'ARN. Dans la perspective des analyses histologiques une partie du foie, du tissu de l'iléon, du tissu du côlon, les muqueuses associées, les tissus adipeux épидидymal et inguinal ont été plongés dans une solution de 300 µl de paraformaldéhyde 4%. Une partie du contenu caecal a été conditionnée dans des cryotubes et plongée dans l'azote liquide en vue du dosage des acides gras à chaînes courtes.

2. Histologie

La préparation des tissus a été effectuée au sein de la plateforme d'histologie de l'UMR 1313 GABI (Génétique Animale et Biologie Intégrative) de l'INRA de Jouy-en-Josas en collaboration avec Stefan Bouet et Abdelhak Boukadiri.

Le foie ainsi que le tissu adipeux inguinal et épидидymal, le côlon et l'iléon ont été analysés par histologie. Les échantillons des souris contrôle et des souris HF ont été prélevés au moment de l'abattage (12 semaines après le début du régime hyperlipidique) et mis dans une solution de paraformaldéhyde 4% et stockés à -80°C. Les échantillons ont ensuite été déshydratés par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant puis dans un bain de toluène avant d'être coulés dans un moule contenant de la paraffine. Les blocs de paraffine sont ensuite coupés au microtome, et réhydratés puis recueillis sur lame de verre. Les lames ont été ensuite colorisées par coloration hémalum-éosine-safran (HES). L'hémalum colore en bleu-violet le noyau, l'érythroisine colore en rouge-rosé le cytoplasme et le safran colore les fibres en jaune-orange.

3. Dosage des cytokines

Le dosage des cytokines a été réalisé en collaboration avec Stéphane Hazebrouck au sein de l'unité d'immuno-allergie alimentaire de l'INRA.

Le prélèvement sanguin nécessaire au dosage des cytokines a été effectué par ponction cardiaque au moment de l'euthanasie de l'animal. Le sang a ensuite été centrifugé à 3500 rpm à 4°C pendant 10 minutes. La fraction surnageante correspondant au plasma a été prélevée et différentes cytokines ont été dosées par méthode Luminex à l'aide du kit « Bio-Plex Pro Assays » développé par Bio-Rad¹⁷. Ce kit permet d'effectuer des dosages immunologiques sur des billes magnétiques.

La technologie Luminex est un système multi analytique qui associe la technique de cytométrie en flux à deux lasers et une utilisation de microbilles en polystyrène. Deux fluorochromes sont incorporés à l'intérieur des billes et pour chaque bille, il existe un ratio précis de la quantité des deux fluorochromes incorporés (Joos et al. 2002). Chaque bille a ainsi son propre code couleur d'identification, et plusieurs billes différentes peuvent être mélangées (une centaine) dans un seul tube ce qui permet le dosage de plusieurs cytokines en simultané (Vignali 2000). Les billes servent de support solide à différentes molécules (ici des anticorps). Les anticorps dirigés contre la cytokine d'intérêt sont couplés de manière covalente aux billes colorées. Les billes chargées de l'anticorps réagissent avec l'échantillon contenant le marqueur biologique d'intérêt. Après une série de lavages pour éliminer les protéines non liées, un anticorps de détection biotinylé est ajouté pour créer un complexe en sandwich (ces dosages sont assez proches des dosages ELISA en sandwich.). Le complexe de détection finale est formé par l'addition de streptavidine-phycoérythrine (SA-PE) conjuguée. La phycoérythrine est un marqueur fluorescent qui permet de révéler la détection de la cytokine d'intérêt (Figure 17).

¹⁷ <http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10014905.pdf>

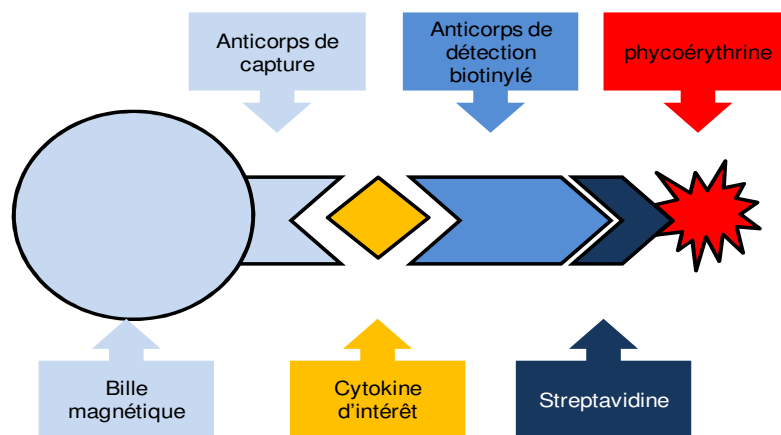


Figure 17 : Principe des interactions moléculaires du dosage Luminex. La cytokine d'intérêt est prise en sandwich entre la bille portant l'anticorps de capture et l'anticorps de détection biotinylé.

La plaque est ensuite insérée dans un lecteur de plaque BioRad Luminex 100¹⁸. Au sein de ce lecteur une combinaison de deux lasers permet la détection spécifique des billes colorées ainsi que du complexe phycoérythrine-streptavidine associé.

Cela permet un dosage quantitatif des cytokines présentes dans les plasmas. Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel bioplex Manager 4.1¹⁹. Nous avons ainsi dosé l'IL-6, l'IL-10, l'IL-17, IFN- γ , MCP-1, TNF- α , Insuline, Résistine et Leptine. L'ensemble des dosages et des analyses ont été effectués au sein de l'unité d'Immuno-Allergie Alimentaire de l'INRA²⁰.

¹⁸ <http://www.bio-rad.com/en-us/product/bio-plex-200-systems>

¹⁹ http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_10003414_rev_a.pdf

²⁰ Laboratoire INRA d'Immuno-Allergie Alimentaire Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse (SPI) Bat. 136, CEA de Saclay 91191 Gif sur Yvette

4. Test de tolérance au glucose

Ce test permet de déterminer les capacités d'une souris à normaliser sa glycémie lors d'une injection de glucose. 9 semaines après le début du régime hyperlipidique, un test de tolérance oral au glucose est effectué sur l'ensemble des souris. Ce test consiste en l'administration d'une quantité standard de glucose par voie orale avec suivi de la réponse physiologique de l'organisme (glycémie et insulïnémie). Des échantillons de sang sont prélevés à intervalles réguliers après absorption du glucose afin de déterminer la vitesse à laquelle il est éliminé de la circulation sanguine.

Les souris sont mises à jeun six heures avant le début de test. Une solution de glucose à 30% leur est administrée à raison de 2g/kg. La glycémie est testée à t0, t20, t40, t60, t90 et t120 minutes. L'insulïnémie est testée à t20 et t60 minutes. L'aire sous la courbe (AUC) de la glycémie est ensuite calculée pour l'ensemble des souris.

5. Analyse de l'expression des gènes par qPCR

L'ensemble des tissus a été broyé à l'aide d'un ultraturax dans du tampon de lyse du kit Mirvana de Life technologies²¹. L'ARN total a ensuite été extrait suivant le protocole issu du kit Mirvana. La concentration des ARN ainsi que leur pureté ont été mesurées à l'aide du spectrophotomètre nanodrop ND-1000²² (Thermo Fisher Scientific) à une longueur d'onde de 260/280 nm. L'intégrité des ARN a été déterminée grâce au bioanalyzer 2100 d'Agilent²³ et les puces « RNA 6000 Nano LabChip²⁴ ». Les échantillons ayant un RIN (Rna Integrity Number) inférieur à 8 (sur une échelle de 1 à 10) ont été systématiquement éliminés (Schroeder et al. 2006).

2 µg d'ARN total ont été rétrotranscrits en ADNc à l'aide du kit High-Capacity cDNA Reverse transcription Kit²⁵ (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les ADNc issus de la rétrotranscription ont été dilués au 1/5ème. Les réactions en chaînes par polymérase (PCR) ont ensuite été effectuées à l'aide de la méthode des sondes TaqMan (Life technologies). La sonde est constituée d'une séquence d'ADNc sur laquelle est fixée un fluorochrome rapporteur en 5' et un inhibiteur de fluorescence en 3'. Le principe de cette méthode, basée sur la détection de fluorescence, repose sur l'activité d'exonucléase 5'-3' de la Taq Polymérase (Figure 18). Au cours de l'étape de polymérisation, les amorces et la sonde Taqman s'hybrident au niveau de leur site complémentaire. L'activité nucléase de 5' de la Taq polymérase déplace et clive la sonde. Cela sépare physiquement le fluorochrome rapporteur et l'inhibiteur, ce qui entraîne la fluorescence. L'augmentation du signal est directement proportionnelle au nombre de molécules libérées au cours de ce cycle. L'accumulation des produits de PCR est détectée directement par le contrôle de l'augmentation de la fluorescence du colorant reporter.

²¹ http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_055423.pdf

²² <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf>

²³ <http://arboretum.harvard.edu/wp-content/uploads/Agilent-2100-Bioanalyzer-Software-Guide.pdf>

²⁴ <http://icob.sinica.edu.tw/pubweb/bio-chem/Core%20Facilities/Data/R401-core/RNA6000Nanomanual.pdf>

²⁵ http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/cms_042557.pdf

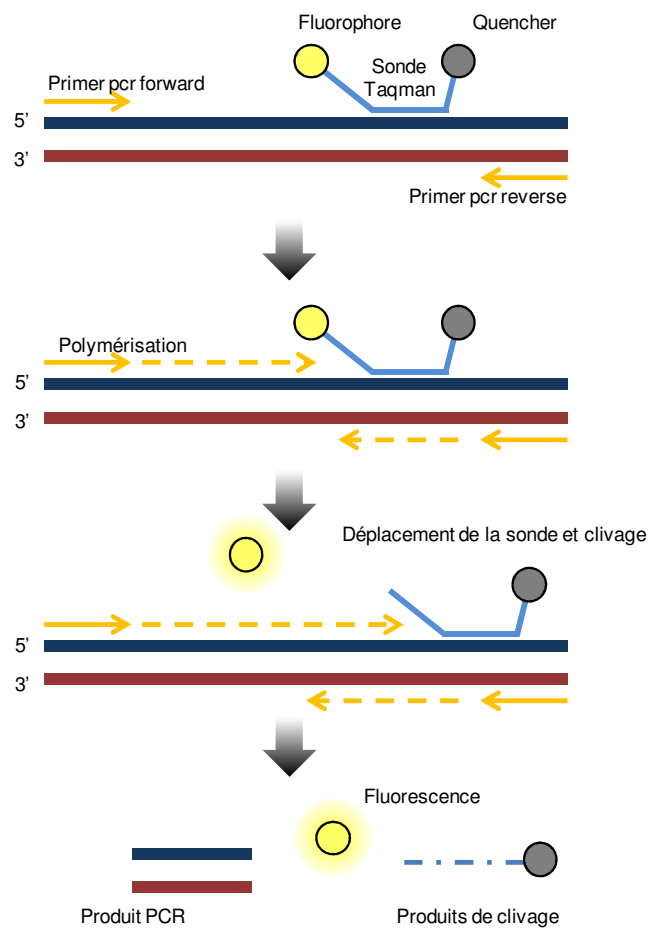


Figure 18 : Principe de la méthode TaqMan. La sonde Taqman se fixe en amont de l'amorce d'amplification. La polymérisation se fait jusqu'à la sonde où la Taq polymérase déplace et clive la sonde grâce à son activité nucléasique en 5'. Cela entraîne alors l'émission d'un signal fluorescent qui est détecté et enregistré.

Nous avons ainsi analysé l'expression de dix à vingt gènes pour chacun des quatre tissus différents : le foie, le muscle, l'iléon et le tissu adipeux inguinal (Tableau 4).

GENES	FOIE	ILEON	TISSU ADIPEUX INGUINAL	MUSCLE
Acetyl-CoA carboxylase	*		*	*
Fatty acid synthase	*		*	
Cluster of Differentiation 36 (CD36)	*	*		*
Carbohydrate-responsive element-binding protein (ChREBP)	*			
Sterol Regulatory Element-Binding Proteins (SREBP1c)	*		*	*
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α)	*			*
Peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR γ)	*		*	*
Tumor necrosis factor alpha (TNF α)	*		*	
Interleukine 6 (IL6)	*		*	
Interleukine 1b (IL1b)	*			
Fatty acid transport protein 4 (FATP4)		*		
Sodium/glucose cotransporter 1 (SGLT-1)		*		
Glucose transporter 2 (GLUT-2)		*		
Fatty acid binding protein 4 (FABP4)		*	*	
Fatty acid binding protein 2 (FABP2)		*		
Monocarboxylate transporter 1 (MCT-1)		*		
Zonula occludens (ZO-1)		*		
Glucagon-like peptide-2 (GLP-2)		*		
Claudin-2 (Cldn2)		*		
Occludine		*		
G-protein-coupled receptor 43 (GPR43)		*	*	
G-protein-coupled receptor 43 (GPR41)		*		
Glucagon-like peptide-1 (GLP-1)		*		
Peptide tyrosine tyrosine (PYY)		*		
Toll-like receptor 4 (TLR4)		*	*	
Toll-like receptor 4 (TLR5)		*		
Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)			*	
Angiopoietin-like 4 (Angptl4)			*	
Glucose transporter type 4 (Glut-4)			*	*
Nuclear factor-kappa B (NFkB)			*	
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 α)				*
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1 β)				*
Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT-1)		*		*
Aconitase (ACO-1)				*
Mitochondrial uncoupling protein 3 (UCP-3)				*
Lipoprotein lipase (LPL)		*		*
Fatty acid-binding protein 1 (FABP1)				*
Insulin receptor substrate 1 (IRS1)				*
Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4 (PDK4)				*
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFkB3)				*
NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex (Ndufa11)				*
Mitochondrial transcription factor A (TFAM)				*
Nuclear respiratory factor 1 (NRF1)				*
Nuclear respiratory factor 1 (NRF2)				*
Total	10	19	13	20

Tableau 4 : Liste des gènes analysés pour leur expression au sein des quatre tissus étudiés.

6. Hybridation *in-situ* en fluorescence couplée à la cytométrie en flux (FISH-FCM)

Une semaine avant et 11 semaines après le début du régime, la composition du microbiote fécal a été évaluée par hybridation *in-situ* en fluorescence (FISH) (Figure 19) suivie d'une analyse en cytométrie en flux (FCM) (Figure 20) (Rigottier-Gois et al. 2003).

La FISH est une technique de biologie moléculaire d'hybridation *in situ* utilisant des sondes nucléotidiques couplées avec un marqueur fluorescent. La sonde ainsi marquée peut s'hybrider sur des séquences cibles de l'ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) bactérien spécifique d'un groupe, d'une classe ou d'une espèce bactérienne. Les séquences d'ARNr 16S sont très fréquemment utilisées pour l'identification et la caractérisation d'espèces bactériennes car il s'agit de molécules ubiquitaires, possédant une séquence très conservée entre espèces proches, et abondantes dans les cellules. L'utilisation d'une combinaison de deux sondes permet de sélectionner spécifiquement les cellules appartenant au domaine bactérien d'une part et d'autre part de cibler un groupe bactérien particulier. Ainsi la sonde « Eub 338 » est spécifique du règne des bactéries, elle s'hybride à l'ARNr 16S de toutes les bactéries et permet de mettre en évidence l'ensemble des Eubactéries présentes dans un échantillon (Amann et al. 1995). La sonde « Non Eub » quant à elle, est utilisée comme contrôle négatif. Elle a été définie pour ne pas s'hybrider avec les bactéries (Wallner et al. 1993) et sert à déterminer le niveau d'auto-fluorescence propre à chaque échantillon. Pour l'hybridation *in situ*, les sondes ont été marquées avec un fluorochrome à leur extrémité 5'. Les sondes Eub 338 et Non Eub ont été marquées soit avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) soit avec l'indodicarbocyanine (CY5). Les sondes spécifiques de groupes ont été marquées avec le fluorochrome CY5. Une fois fluoromarquées, les bactéries sont passées en cytométrie en flux.

La cytométrie en flux est une technique qui permet de mesurer sur une suspension de particules (cellules, bactéries, parasites...) les caractéristiques individuelles de chaque particule telles que la taille, la forme et la complexité et n'importe quel composant ou fonction qui puisse être détecté à l'aide d'un composé fluorescent. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est donc multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde. Les cellules en suspension passent une à une devant un ou plusieurs faisceaux lasers et des détecteurs captent des signaux émis par chaque cellule tels que :

- La lumière diffusée aux petits angles (Forward Scatter, FSC) qui renseigne sur la taille des particules.
- La lumière diffusée à 90 degrés (Side Scatter – SSC) qui renseigne sur la forme, la structure interne et la granularité des particules.
- Les signaux de fluorescence :
 1. Fluorescence émise par la cellule elle-même (autofluorescence)
 2. Fluorescence émise par un fluorochrome associé à une sonde ADN et qui se lie spécifiquement à la cellule.

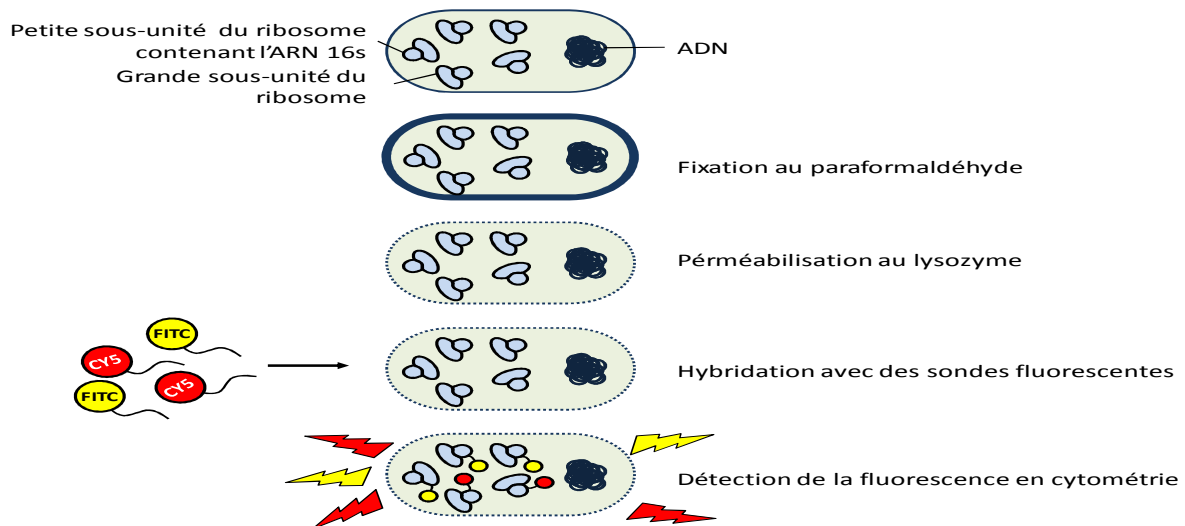


Figure 19 : Représentation schématique des principales étapes de l'hybridation *in situ* en fluorescence.

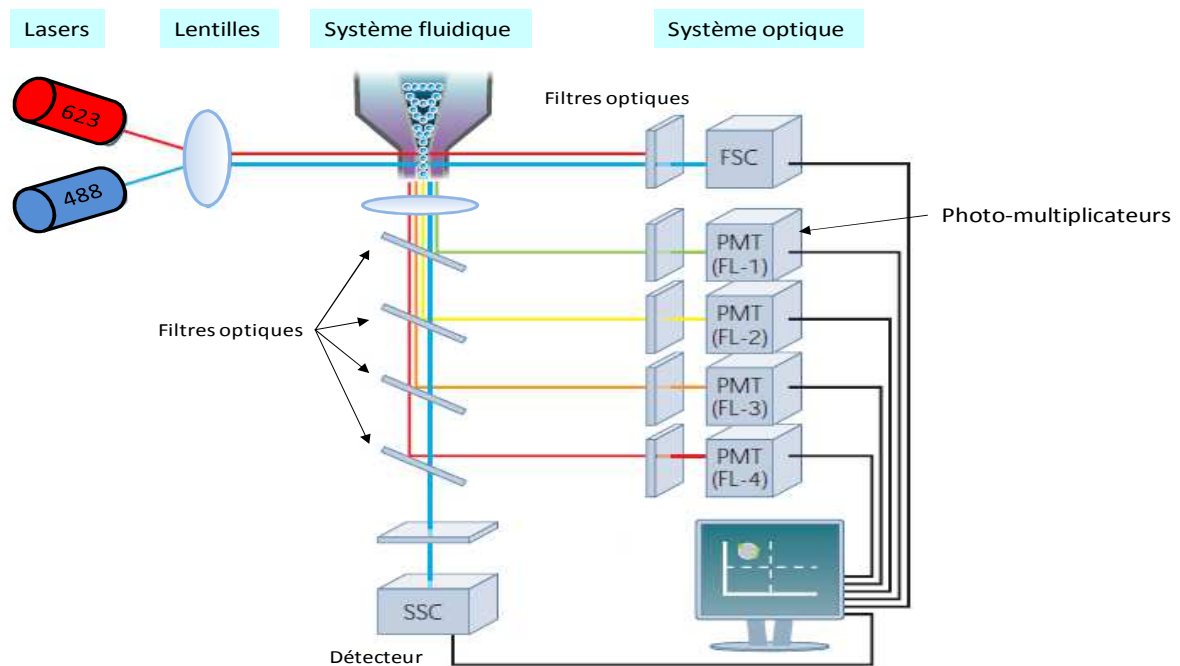


Figure 20 : Représentation schématique du circuit optique du FACSCalibur (Bd Biosciences) (d'après « Introduction to flow cytometry » Misha Rahman²⁶). Le système est équipé d'un double laser, un laser bleu émettant à 488 nm et un laser rouge émettant à 623 nm. Les lasers interceptent la cellule passant au niveau du cône fluide. Un détecteur de dispersion lumineuse frontale détecte toute dispersion lumineuse qui est dirigée vers l'avant (FSC) et un second détecteur reçoit la lumière déviée à 90°C (SSC). Une seconde lentille de focalisation permet de diriger les rayons lumineux vers un ensemble de filtres qui permettent de séparer les différentes longueurs d'onde en présence.

²⁶ <http://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/flowcytometry.pdf>

Les données obtenues à partir des suspensions hybridées avec les sondes « Non Eub-FITC » et « Eub 338-FITC » permettent de définir la proportion de bactéries hybridées spécifiquement avec la sonde « Eub 338-FITC ». Les contrôles avec les sondes « Non Eub-CY5 » et « Eub 338-CY5 » servent à valider les résultats obtenus avec les sondes « Non Eub-FITC » et « Eub 338-FITC » en confirmant le nombre d'événements correspondants à des bactéries hybridées avec la sonde « Eub 338-Cy5 ». Après avoir réalisé ces contrôles, les dénombrements des groupes sont effectués en combinant une sonde CY5 de groupe et la sonde « Eub338-FITC ». On obtient ainsi la proportion de bactéries marquées avec la sonde CY5 de groupe parmi l'ensemble des bactéries marquées avec la sonde « Eub 338 FITC » (après correction des effets dus à l'auto-fluorescence des sondes).

Les sondes nucléotidiques utilisées ciblant les différents ARNr 16S d'intérêts sont listées dans le Tableau 5. Ces sondes ont été utilisées afin d'évaluer les proportions relatives de chacun des neuf groupes taxonomique : *Clostridium coccoïdes*, *Clostridium leptum*, *Atopobium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Enterobacteria*, *Lactobacillus-Enterococcus*, *Erysipelotrichi* et *Mouse Intestinal bacteria*. La technique de FISH permet ainsi d'obtenir une identification phylogénétique du microbiote et possède l'avantage d'être rapide, quantitative, et peu chère. Son principal inconvénient réside dans le fait que l'on peut visualiser uniquement les groupes bactériens ciblés et qu'elle est incapable d'identifier de nouvelles espèces bactériennes. L'association de la FISH avec la cytométrie en flux a été très utilisé dans l'analyse du microbiote (Gérard et al., 2007; Respondek et al., 2013; Rigottier-Gois et al., 2003)

PROBE	SEQUENCE 5'->3'	TARGET	FLUOROCHROM	REFERENCE
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'FITC	(Amann et al., 1990)
NonEub338	ACATCCTACGGGAGGC	none	5'CY5	(Amann et al., 1990)
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'FITC	(Wallner et al., 1993)
Eub338	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	domain Bacteria	5'CY5	(Wallner et al., 1993)
Erec482	GCTTCTTAGTCAGGTACCG	<i>Clostridium coccoïdes</i> group	5'CY5	(Franks et al. 1998)
Clep866	GGTGGATWACTTATTGTG – comp1 GGTGGAWACTTATTGTG –comp2 GGTGGATWACTTATTGCG	<i>Clostridium leptum</i> group	5'CY5	(Lay et al. 2005)
Ato291	GGTCGGTCTCTCAACCC	<i>Atopobium</i> cluster	5'CY5	(Harmsen et al. 2000)
Bac303	CCAATGTGGGGGACCTT	<i>Bacteroides-Prevotella</i> group	5'CY5	(Manz et al., 1996)
Bif164	CATCCGGCATTACCACCC	<i>Bifidobacterium</i> genus	5'CY5	(Langendijk et al. 1995)
Enter1432	CTTTTGCAACCACT	<i>Enterobacteria</i>	5'CY5	(Sghir et al. 2000)
Lab158	GGTATTAGCAYCTGTTTCCA	<i>Lactobacillus-Enterococcus</i>	5'CY5	(Sghir et al. 2000)
MIB661	GCATTCCGCATACTTCTC	<i>Mouse Intestinal Bacteria</i>	5'CY5	(Hermie J. M. Harmsen Frits)
sEcy1387	CGCGGCATTGCTCGTTCA	<i>Erysipelotrichi</i>	5'CY5	(Salzman et al. 2002)
				(Hermie et al., 2002)

Tableau 5 : Liste des sondes utilisées pour l'analyse de FISH couplée à la cytométrie en flux. La sonde Clep866 utilise deux oligonucléotides compétiteurs non marqués permettant d'éviter les hybridations croisées et d'améliorer la détection de la région cible de l'ARNr16.

6.1. Fixation des échantillons fécaux

Au moment des prélèvements, les fèces de chaque souris ont été homogénéisées au vortex dans du tampon phosphate salin PBS 1x (NaCl : 130 mM, NaH₂PO₄ 2H₂O : 3mM, Na₂HPO₄ 12H₂O : 7mM, pH 7.2) puis réparties en 3 fractions de 200µl dans 3 tubes eppendorfs de 1,5 mL auxquelles ont été ajoutées 0,6 mL de paraformaldéhyde à 4% (PFA). L'ensemble des tubes a été placé une nuit à 4°C pour fixation.

6.2. Perméabilisation

100 µl de chaque suspension bactérienne fixée au PFA 4% sont ajoutés à 900 µl de PBS 1x puis les bactéries fécales sont culotées pendant 3 minutes à 8000 g. Les culots sont lavés avec 1 mL de tampon TRIS-HIS (Tris-HCl : 100 mM, 50mM EDTA, pH 8) puis centrifugés pendant 3 minutes à 8000 g et resuspendus avec 1 mL de tampons TRIS-HIS contenant 1 mg.ml⁻¹ de lysozyme, puis homogénéisés par retournements successifs et incubés 10 minutes à température ambiante. Les tubes sont centrifugés pendant 3 minutes à 8000 g et les culots sont lavés et homogénéisés avec 1 mL de tampon PBS 1x puis centrifugés pendant 3 minutes à 8000 g. Les surnageants sont éliminés aux déchets biologiques.

6.3. Hybridation

Les culots sont resuspendus avec 1 mL de tampon d'hybridation (NaCl : 900 mM, Tris-HCl : 20 mM, 0.1% SDS, 30% formamide, pH 8), puis centrifugés pendant 3 minutes à 8000 g et remis en suspension dans 700 µl de tampon d'hybridation et homogénéisés. 40 µl de chaque suspension sont ensuite utilisés pour l'hybridation avec chaque couple de sonde plus les sondes contrôles au sein d'une microplaque 96 puits. 10 µl de solution de sondes sont ajoutés. Chaque sonde contenue dans la solution d'hybridation est à une concentration de 4 ng.µl⁻¹. La microplaque est alors mise une nuit à 35°C et à l'obscurité. Après hybridation, 150 µl de tampon d'hybridation sont ajoutés dans chaque puit. La plaque est homogénéisée et centrifugée 15 minutes à 4000 rpm et le surnageant est éliminé par retournement de la plaque. 200 µl de solution de lavage (NaCl : 64 mM, Tris-HCl : 20 mM, 0,1% SDS, pH 8) sont ajoutés aux culots puis la plaque est incubée 20 minutes à 37°C, centrifugée pendant 15 minutes à 4000 rpm et le surnageant éliminé par retournement unique de la microplaque. Chaque culot est alors resuspendu dans 200 µl de PBS 1x. Pour chaque puits un aliquot de 100 µl est prélevé et ajouté à 0,5 mL de FACSFlow™ (Becton Dickinson) en vue de l'acquisition des données en cytométrie de flux.

6.4 Détection

Le signal de la fluorescence émis par les sondes hybridées est mesuré et quantifié. La double fluorescence émise simultanément par la sonde CY5 ciblant un groupe d'intérêt et la sonde « Eub338-FITC » est détectée lors du passage en cytométrie. Les bactéries ainsi doublement marquées sont comptabilisées et on obtient la proportion de bactéries marquées avec la sonde d'intérêt parmi les bactéries marquées avec la sonde Eub.

7. Dosage des Acides gras à chaînes courtes (AGCC)

Les proportions relatives d'AGCC présents dans le contenu caecal, reflet de l'activité métabolique du microbiote intestinal, sont analysées suivant la méthode d'Ottenstein et Barley (Ottenstein & Bartley 1971), modifiée par Szylit et coll (SZYLIT et al. 1988). Les AGCC sont extraits du contenu caecal à l'eau, l'extrait est déprotéinisé par précipitation à l'acide phosphotungstique puis analysé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (capillaire de polyéthylène glycol) à l'aide d'un détecteur universel d'ionisation de flamme. La quantification se fait par étalonnage interne, le 2-ethyl butyrate est utilisé comme étalon interne.

7.1. Traitement des échantillons de contenu caecal

Les échantillons de contenus caeaux sont homogénéisés dans l'eau ultrapure (milliQ) à raison de 1 mL/g, placés à 4 °C pendant 2 h puis centrifugés (15 min, 12000 g, 4 °C). Le surnageant obtenu est prélevé et 100 µL d'une solution saturée d'acide phosphotungstique (VWR) y sont ajoutés. Le mélange est laissé une nuit à 4 °C puis centrifugé (30 min, 12000 g, 4 °C). Huit cents microlitres du surnageant obtenu sont prélevés et 200 µL de solution d'étalon interne de 2-éthyl-butyrate (Supelco, Saint-Quentin Fallavier, Quasi-totalité) y sont ajoutés avant analyse par CPG.

7.2. Dosage des AGCC par CPG

La CPG est une technique de chromatographie, qui permet de séparer des molécules de nature diverse dans un mélange complexe. Comme toutes les techniques de chromatographie, elle est basée sur la différence de répartition des divers composés d'un mélange entre une phase fixe (ou stationnaire) et une phase mobile (ou éluant) qui se traduit par une migration différentielle des divers composés. Elle s'applique principalement aux composés gazeux ou susceptibles d'être vaporisés par chauffage sans décomposition.

Le mélange à analyser est vaporisé à l'entrée d'une colonne capillaire en verre, qui est tapissée par une substance active solide ou liquide appelée phase stationnaire, puis il est transporté à travers celle-ci à l'aide d'un gaz porteur (ou gaz vecteur). Les différentes molécules

du mélange vont se séparer et sortir de la colonne les uns après les autres après un certain laps de temps qui est fonction de l'affinité de la phase stationnaire avec ces molécules. En sortie de colonne, l'éluat pénètre alors au niveau d'une flamme obtenue par combustion d'hydrogène et d'air. La quasi-totalité des composés organiques, lorsqu'ils brûlent dans une flamme air-hydrogène, émettent des ions en nombre quasi proportionnel au nombre d'atomes de carbone brûlés. Les composés ionisés sont alors collectés par deux électrodes entre lesquelles on applique une différence de potentiel. Il en résulte un courant électrique recueilli par un électromètre qui le transforme en courant que l'on peut amplifier et enregistrer.

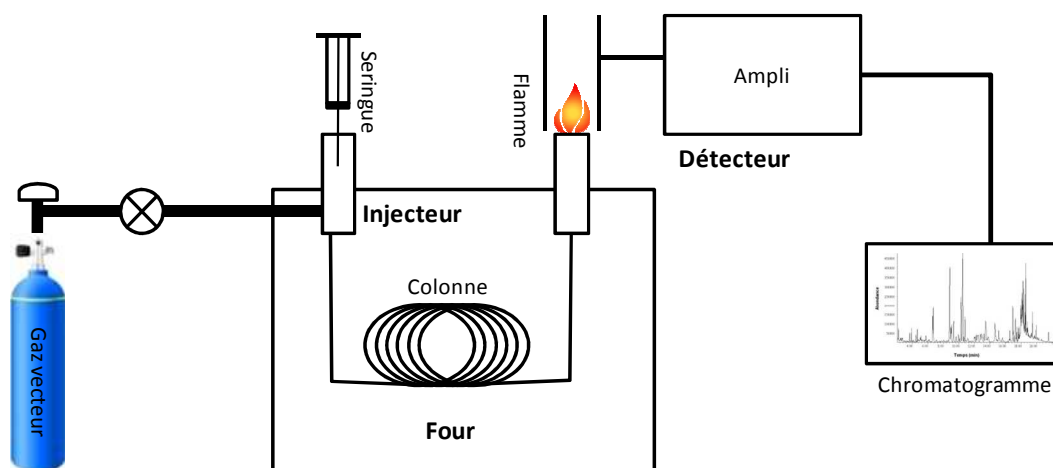


Figure 21 : Représentation schématique de la chromatographie en phase gazeuse.

Le dosage est réalisé sur un appareil Autosystem (Perkin-Elmer, Les Ulis, France) composé d'un injecteur automatique, un four à colonne et un détecteur à ionisation de flamme. Un volume de 0,1 μL d'échantillon est injecté à l'aide d'un injecteur split splitless maintenu à 200°C, dans une colonne nukol de polyéthylène glycol (15m x 0.53mm x 0.5 μm , Supelco). La séparation est effectuée à température constante (100°C) pendant 18 min. Le gaz vecteur utilisé est le dihydrogène à un débit de 9,5 mL/min. Les AGCC sont détectés par le détecteur à ionisation de flamme réglé à 240°C. L'acquisition et le traitement des données sont effectués à l'aide du logiciel TotalChrom Navigator (version 6.3.2).

8. Métagénomique

Le séquençage des métagénomes bactériens a été effectué au sein de la plateforme MetaQuant (MetaGenoPolis, INRA Jouy-en-Josas) en collaboration avec Sean Kennedy et les analyses bioinformatiques ont été effectuées en collaboration avec Emmanuelle Le Chatelier (MetaGenoPolis, INRA Jouy-en-Josas).

La métagénomique est un procédé méthodologique visant à étudier le contenu génétique d'un échantillon issu d'un environnement complexe. Le but de cette approche, via le séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, est d'avoir non seulement le nombre de gènes du contenu de l'échantillon mais aussi un aperçu de son potentiel fonctionnel ainsi que sa description taxonomique (Figure 22).

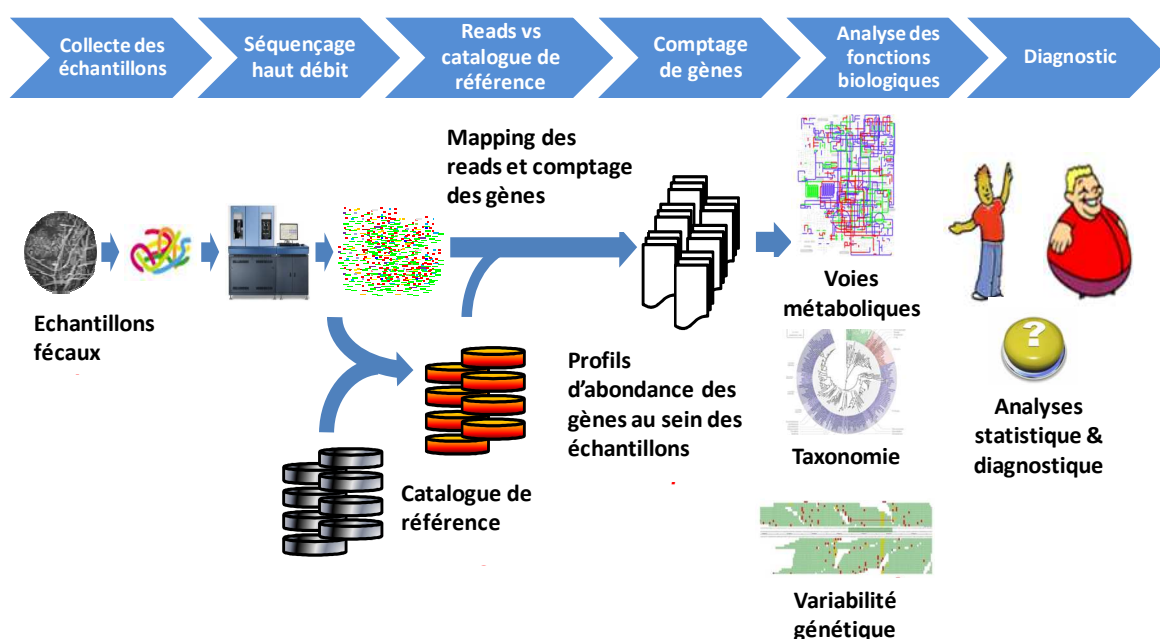


Figure 22 : Les grandes étapes d'une analyse de métagénomique quantitative. De la collecte d'échantillons jusqu'au diagnostic.

8.1. Extraction d'ADN

L'ADN de 7 souris répondeuses et 7 souris non répondeuses a été extrait à partir des fèces prélevées au moment de l'abattage. Les bactéries contenues dans les fèces sont lysées à l'aide de billes en verre et d'une solution de Thiocyanate de guanidine et de N-Lauroyl sarcosine. Puis les molécules aromatiques sont précipitées à l'aide du polyvinylpolypyrrolidone (PVPP). Les acides nucléiques et les protéines sont séparés par ajout d'isopropanol et les ARN sont ensuite dégradés par ajout de Rnase. L'ADN est purifié par ajout successif d'éthanol 100% et 70%, puis le culot sec est repris dans du tampon d'élution Tris-EDTA. Pour chaque échantillon les concentrations d'ADN sont ajustées à 0,1 µg/µl avant d'être séquencées.

8.2. Préparation de la banque

Avant le séquençage à proprement parler, les échantillons d'ADN ont été contrôlés pour leur concentration à l'aide du kit « Qubit® dsDNA BR Assay » d'Invitrogen et leur intégrité a été contrôlée à l'aide du kit « Standard Sensitivity Genomic DNA Analysis » de Labgene et de l'appareil « Fragment Analyzer™ » d'Advanced Analytical.

Pour chaque échantillon, une banque de fragment est préparée à l'aide du kit « 5500 SOLiD® Fragment 48 Library Core Kit » de Life Technologies. L'ADN de chaque échantillon est fragmenté par ultrasonication (Covaris® E220 system) puis des adaptateurs de séquençage sont ajoutés. Les molécules sont alors sélectionnées par éluions différentielles (Agencourt® Beckman Coulter).

8.3. Technique de séquençage SOLiD

Le séquençage de type « shotgun » permet de séquencer directement le contenu global de la partie dominante et sous-dominante des génomes du microbiote intestinal. Il est alors possible d'évaluer la présence et l'abondance relative de fragments génomiques au sein d'un échantillon.

Les fragments associés aux adaptateurs de séquençage sont amplifiés par 5 cycles de PCR en émulsion. L'ADN préparé est déposé sur une lame puis une amplification monoclonale des séquences est effectuée. Les réactifs de séquençage sont ajoutés (sondes fluorescentes et ligase). Chaque base est séquencée par cycle, et le signal de fluorescence et sa qualité sont décodés et stockés dans un fichier de séquence (Figure 23).

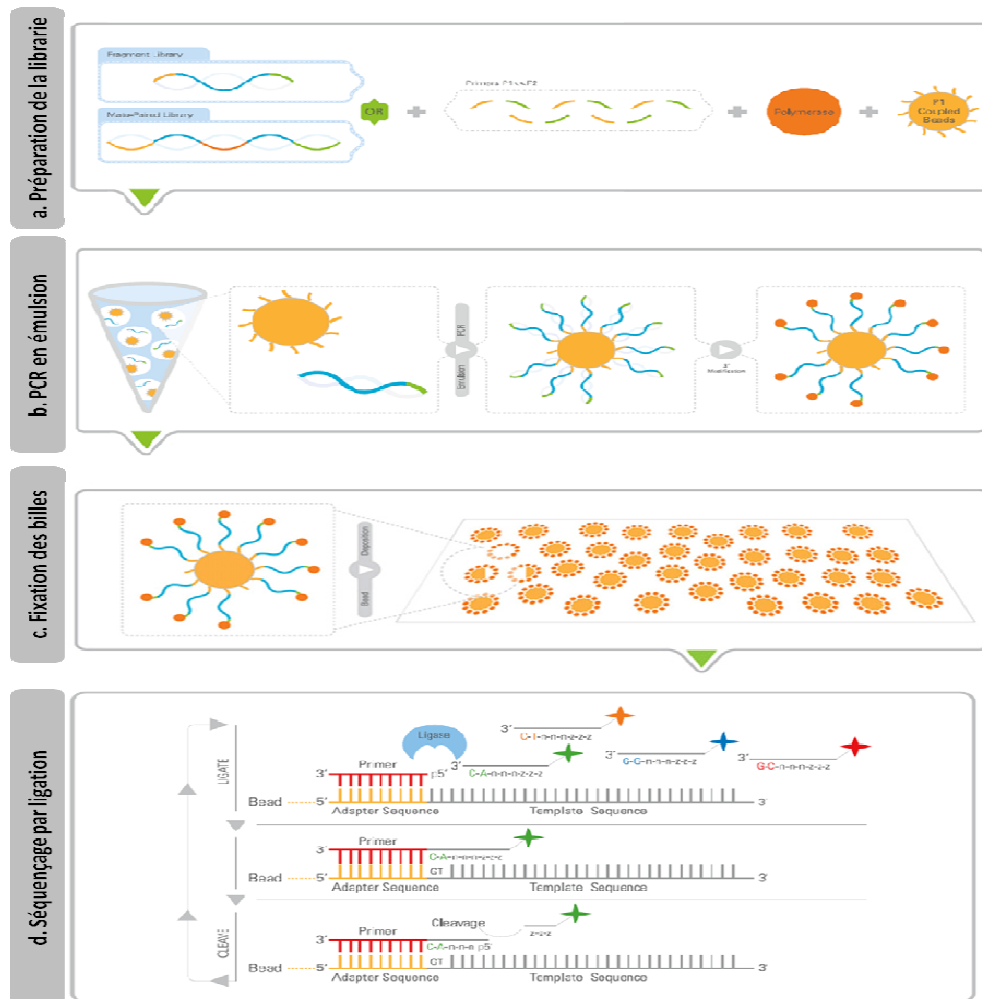


Figure 23 : Principe de la technique de séquençage SOLiD. **a.** Construction d'une banque de fragments d'ADN encadrés par deux adaptateurs. **b.** La PCR en émulsion permet d'obtenir une amplification clonale des fragments d'ADN fixés sur chaque microbille. **c.** Chaque microbille est alors fixée sur une lame de verre de façon covalente après modification des extrémités 3' des fragments d'ADN amplifiés. **d.** Chaque microbille subit ensuite la réaction de séquençage par ligation : les sondes oligonucléotidiques fluoromarquées sont liguées à l'amorce fixée sur le fragment d'ADN. Plusieurs cycles de ligation-détection-clivage sont alors effectués.

Nous avons sélectionné 7 souris répondeuses et 7 souris non répondeuses à analyser en métagénomique. Les souris ont été choisies sur la base de l'ACP des 50 souris ayant reçu le régime hyperlipidique (Figure 43).

- NR : H23, H2, H8, H15, H31, H40, H46
- R : H27, H35, H36, H37, H41, H42, H50

Nous avons comparé les métagénomes de ces 7 souris répondeuse et de ces 7 souris non répondeuses 1 semaine avant et 12 semaines après le début du régime hyperlipidique (28 échantillons en tout) afin de détecter des signaux (profils taxonomiques et fonctions des gènes du microbiote notamment) permettant de prédire leur statut répondeur/non répondeur d'une part, de visualiser les effets du régime hyperlipidique ainsi que les différences induites par le régime

entre les deux groupes de souris, et de comparer les souris répondeuses et non répondeuses après le régime hyperlipidique d'autre part.

8.4. Analyses bioinformatiques

L'analyse métagénomique est rendue possible par l'existence d'un catalogue de référence du microbiote fécal murin de 2.6 millions de gènes non redondants construit à partir de 184 souris d'origine variée (différentes souches, régimes alimentaires variés, différents fournisseurs, différents laboratoires). Les données générées par le séquençage sont contenues dans 2 fichiers comprenant les données brutes ainsi que les valeurs de qualité des séquences associées au séquençage. Le logiciel Meteor développé par Nicolas Pons utilise ces fichiers pour effectuer la comparaison avec le catalogue de référence du métagénome de la souris de 2,6 millions de gènes afin de déterminer le nombre de gènes et d'espèces présents dans chacun de nos 28 échantillons. Les reads mappés sont ainsi indexés par Meteor permettant par la suite l'accès aux gènes, à leurs fonctions, à leur phylogénie associée, et d'effectuer des analyses de co-variation. Une matrice de fréquence de gènes de tous les échantillons est ensuite générée pour les analyses ultérieures.

Le chaînage des analyses informatiques peut se résumer en plusieurs étapes :

- Identifier les différences dans les fréquences de gènes entre les groupes répondeurs et non répondeurs avant et après régime hyperlipidique. C'est le comptage de gènes.
- L'analyse phylogénétique des gènes discriminants entre les groupes répondeurs et non répondeurs. Cette analyse peut passer par l'analyse des co-variations de gènes entre les différentes souris et les regrouper en cluster (MGS/CAG ou méta-espèces) afin d'identifier les co-variations entre ces clusters et les groupes répondeurs et non répondeurs avant et après régime hyperlipidique.
- La caractérisation des fonctions des gènes par comparaison avec des bases de données de référence KEGG, COG, NOG et l'identification des différences fonctionnelles des métagénomes entre les groupes répondeurs et non répondeurs.

8.5. Comptage de gènes

Les « reads » (courtes séquences d'environ 50pbs) obtenus après séquençage sont mappés sur le catalogue du métagénome de la souris 2.6 millions de gènes. Au total, 1, 3 millions de gènes (1 370 374) issus du séquençage de nos 28 échantillons sont mappés sur ce catalogue. Seuls les « reads uniques » mappant un seul gène du catalogue sont alors gardés et le nombre de gènes ainsi mappés a ensuite été compté. On obtient dans notre analyse entre 318 et 659 mille gènes pour chacun des échantillons. Afin de réduire la variabilité technique liée à la différence de profondeur de séquençage entre les différents échantillons, une étape de normalisation des données (« downsizing ») a ensuite été réalisée en fonction de l'échantillon ayant la plus faible profondeur de séquençage, puis une autre étape de normalisation a eu lieu prenant en compte la longueur des gènes mappés.

8.6. Annotation fonctionnelle des gènes

1 610 396 gènes du catalogue du métagénome de la souris sont fournis avec une annotation fonctionnelle ($\approx 60\%$ du catalogue). 2 bases de données d'annotation ont été utilisées : KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (Kanehisa et al., 2004) et COG (Clusters of Orthologous Groups) (Tatusov et al. 2003). Les deux bases de données d'annotation contiennent des catégories de fonctions métaboliques organisées en plusieurs niveaux hiérarchiques: KEGG annote les enzymes en fonction des voies métaboliques connues tandis que COG utilise les relations évolutives des gènes (orthologues) pour former des groupes de gènes fonctionnels. Les gènes de la base de données KEGG sont également regroupés en clusters d'orthologie (KEGG orthology ou KO) et par voies métaboliques (map). 22 587 clusters fonctionnels (contenant entre 1 à 66183 gènes) ont été constitués sur la base des 28 échantillons : 3555 COG, 13703 NOG, 5059 KO et 1670 map.

8.7. Annotation taxonomique des gènes

4 bases d'annotation différentes ont été utilisées pour l'annotation des gènes :

- Base de données IMOMI : 6161 génomes (août 2012)
- Base de donnée HMDB : « Human Microbiome Databank » (novembre 2014)
- Base de données nt : Toutes les séquences nucléotidiques disponibles (novembre 2014)
- Base de données WGS : « Whole Genome Shotgun Submission » (novembre 2014)

L'algorithme d'alignement Mega BLAST a été utilisé sur les 4 bases de données pour annoter les gènes du catalogue : 1 623 056 gènes ($\approx 60\%$) ont été annotés : 701 000 gènes avec plus de 90% d'alignement ($\approx 20\%$) et 184 000 gènes ($\approx 7\%$) ont pu être annotés au niveau taxonomique de l'espèce (plus de 90% d'alignement et plus de 95% d'identité) (Figure 24). Il y a donc peu de gènes identifiés en termes d'espèces au sein du catalogue. Par ailleurs, l'annotation taxonomique des gènes de l'ensemble des 28 échantillons révèle que seulement 10 000 gènes identifiés sont assignés à une espèce ($\approx 8\%$) (Figure 24). La stratégie a alors été de clusteriser les gènes en MGS (« Meta Genomics Species »).

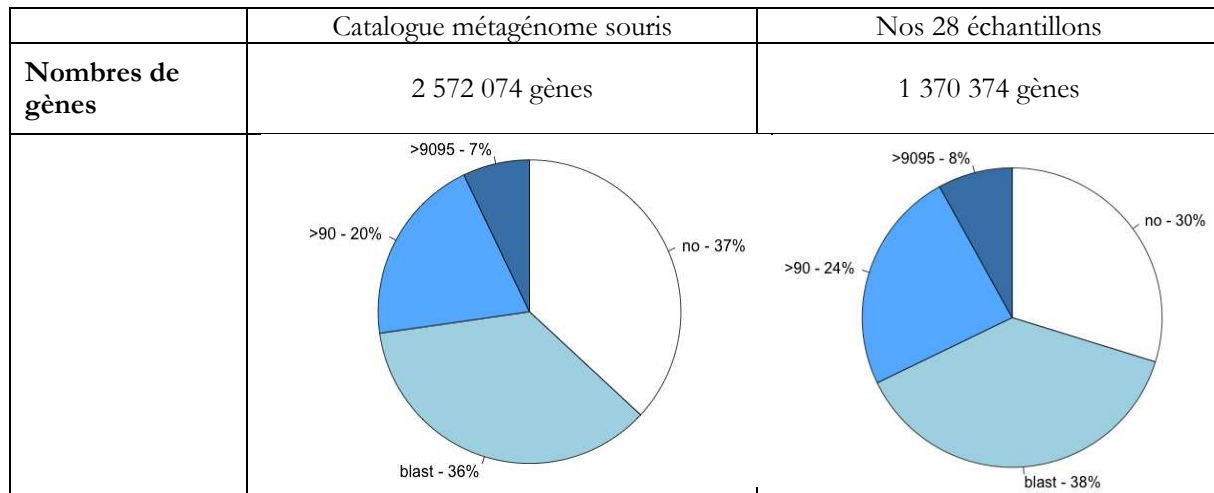


Figure 24 : Annotation taxonomique des gènes du catalogue du métagénome de la souris. 37% des gènes du catalogue du métagénome de la souris n'ont pas d'identification taxonomique et 7% sont assignés à une espèce. 30% des gènes identifiés dans nos 28 échantillons n'ont pas d'assignation taxonomique et 8% des gènes identifiés ont pu avoir une assignation au niveau de l'espèce.

8.8. Clusterisation du catalogue de gènes en espèces métagénomiques

Le catalogue de gènes a été clusterisé en MGS/CAG en utilisant la méthode Canopy (Nielsen et al. 2014). La clusterisation des gènes en MGS/CAG permet d'identifier les bactéries contenues dans chaque échantillon en regroupant les gènes en fonction de leur profil de co-abondance (Figure 25). La méthode Canopy permet de regrouper des gènes autour d'un gène graine, en utilisant une matrice d'abondance. Ensuite, une étape de regroupement est effectuée : on sélectionne aléatoirement un gène graine et on réunit tous les gènes ayant une corrélation Pearson supérieure à 0,9 et une corrélation Spearman supérieure à 0,6 avec cette graine dans un même cluster. Tous les clusters de moins de 3 gènes sont supprimés, et un vecteur médian de signal d'abondance est généré pour chaque cluster restant. Les vecteurs médians sont comparés entre eux par corrélation Pearson. Si des vecteurs médians possèdent entre eux une corrélation supérieure à 0,97, les gènes du cluster les représentants sont alors fusionnés. Ces étapes sont répétées jusqu'à ce que tous les gènes non clustérisés aient été traités au moins une fois. Une MGS est un cluster de plus de 500 gènes et un CAG (Co-Abondance gene Group) est un cluster de moins de 500 gènes. L'algorithme a été implémenté en R.

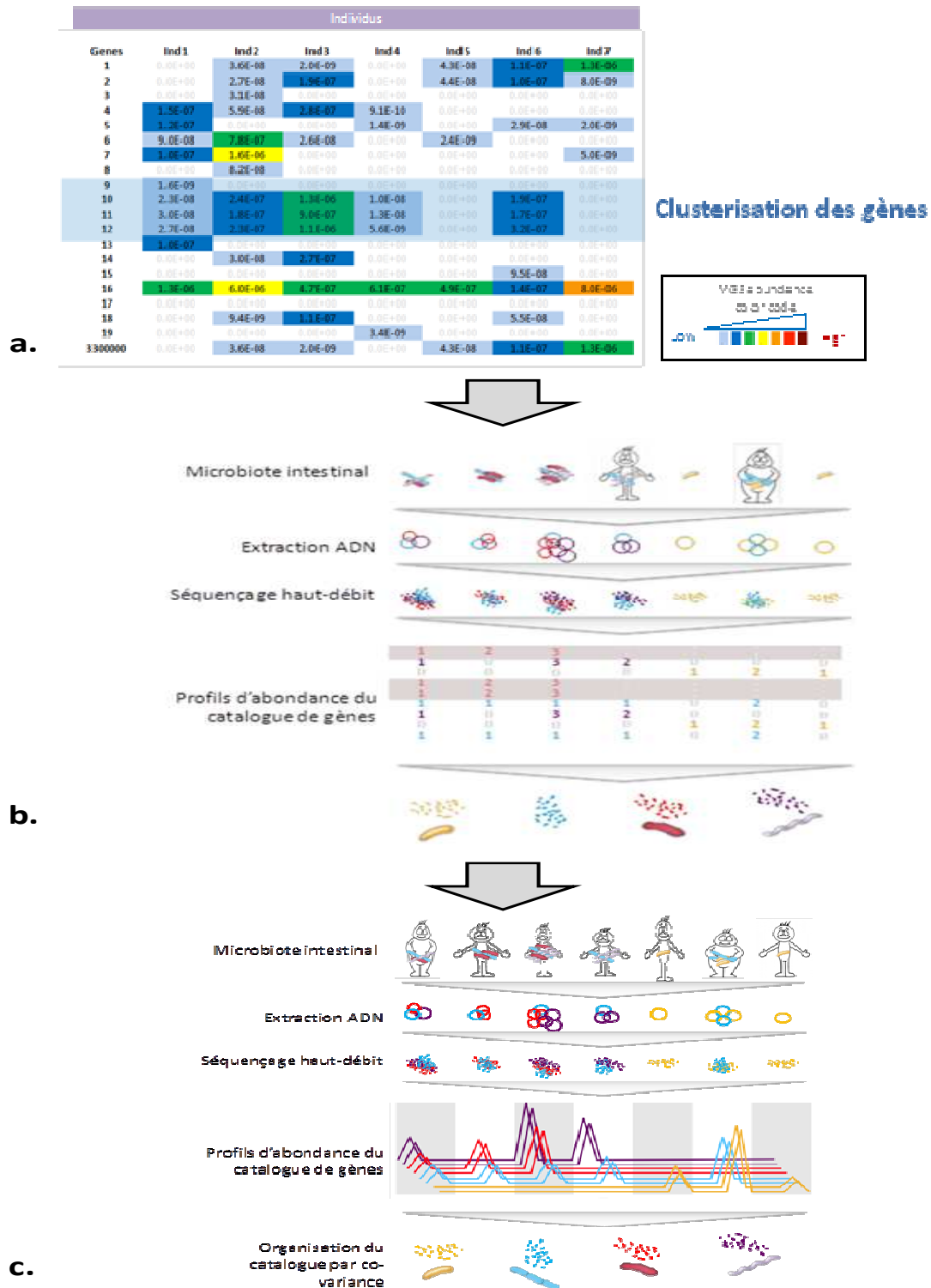


Figure 25 : Clusterisation des gènes en MGS/CAG en fonction de leur profils de co-abondance. a. On cherche à identifier les bactéries contenues dans chaque échantillon. On part d'une matrice de comptage de gènes normalisés (les couleurs correspondent à l'abondance du signal). **b.** On crée ainsi des profils d'abondance des gènes du catalogue. **c.** Clusterisation par co-abondance : les gènes sont regroupés en fonction de leur profil de co-abondance. Dans cet exemple on identifie 4 types de profils différents (violet, rouge, jaune et bleu) qui correspondent à 4 MGS/CAG différents. Tous les gènes ayant un profil similaire appartiendront à la même CAG. Les CAG de plus de 500 gènes sont des MGS.

8.9. Annotation taxonomique des MGS/CAG à partir de l'annotation des gènes

L'annotation taxonomique des MGS a été faite en utilisant l'annotation taxonomique des gènes du catalogue de référence. Un cluster est assigné au rang de l'espèce si au moins 80% de ses gènes ont l'annotation requise et que chaque gène du cluster possède au moins 90% d'alignement de séquence et 95% d'identité (BlastN). Un cluster est assigné à un plus haut rang taxonomique (genre, famille, ordre ou classe) si au moins 80% de ses gènes sont assignés à la même taxonomie (Tableau 6).

row.names	size	NA_pc	BHit_pc	BHit	BH_all	BH_id	NA_pc_Taxo_pcTaxo	Taxo_all	Taxo_id	Taxo_level		
CAG00001_2	20170	7,0	22,1	Reyranella massiliensis	92,3	83,8	7,0	39,2	Alphaproteobacteria	89,2	87,5	class
CAG00036_all_left	4655	35,4	12,4	Clostridium sp. CAG:91	64,4	77,1	35,4	33,2	Lachnospiraceae	55,6	79,3	family
CAG00038_all_left	4604	19,0	51,6	Dorea sp. 5-2	89,5	82,7	19,0	31,6	Dorea sp. 5-2	89,5	82,7	genus
CAG00735_all_left	4417	36,8	11,9	Clostridium sp. CAG:91	64,9	76,9	36,8	30,7	Lachnospiraceae	52,5	78,4	family
CAG00033_1	4288	33,5	25,4	Lachnospiraceae bacterium 28-4	74,7	77,7	33,5	38,4	Lachnospiraceae	65,2	77,9	family
CAG01008_all_left	4203	25,3	33,5	Lachnospiraceae bacterium 10-1	78,4	78,8	25,3	66,9	Lachnospiraceae	68,9	78,7	family
CAG00056_all_left	4189	37,4	7,5	Clostridium sp. ASF502	64,0	77,6	37,4	32,4	Lachnospiraceae	55,3	78,1	family
CAG00046_10	4150	40,2	11,2	Firmicutes bacterium CAG:65	65,7	76,1	40,2	36,5	Clostridiales	55,4	77,9	order
CAG00037_1	4146	1,5	83,5	Bacteroides intestinalis DSM 17393	97,9	97,8	1,5	83,5	Bacteroides intestinalis	97,9	97,8	species
CAG00767_all_left	4013	20,7	31,4	Lachnospiraceae bacterium 28-4	83,7	80,9	20,7	31,4	Lachnospiraceae bacterium 28-4	83,7	80,9	genus
CAG00067_all_left	4006	0,4	85,4	Bacteroides vulgatus PCS10	98,4	99,2	0,4	95,0	Bacteroides vulgatus	99,1	99,3	species
CAG01891_all_left	3996	38,7	11,0	Clostridium sp. CAG:91	65,0	76,6	38,7	37,9	Clostridiales	55,2	77,8	order

Tableau 6 : Annotation taxonomique des MGS. Les résultats sont classés par rang taxonomique. Encadré en bleu, les résultats concernant le rang taxonomique le plus bas identifié. Encadré en vert, les résultats concernant les rangs taxonomiques (ordre, famille, genre retenus). **En bleu :** Row.names : nom du cluster de gènes, size : nombre de gènes au sein du cluster, NA_pc : pourcentage de gènes non annotés, BHits_pc : pourcentage de gènes annotés à ce rang taxonomique, BHit : assignation taxonomique, BH_align : séquences des gènes du cluster alignés à ce rang taxonomique (en %), BH_id : identité de séquences des gènes du cluster à ce rang taxonomique (en %). **En vert :** NA_pc : pourcentage des gènes du cluster non annotés, Taxo_pc : pourcentage des gènes annotés à ce rang taxonomique, Taxo : assignation taxonomique, Taxo_all : séquences alignées à ce rang taxonomique (en%), Taxo_id : identité de séquence du cluster à ce rang taxonomique (en%), Taxo_level : rang taxonomique assigné au cluster.

281 MGS de plus de 500 gènes ont été identifiés. 10% des MGS ont été identifiées en terme d'espèces, 56% des MGS ont été assignées au rang de l'ordre ou de la famille et 12% des MGS n'ont pas d'annotation taxonomique. 957 CAG de moins de 500 gènes ont été identifiés. 6% des CAG ont été assigné à une espèce, 34% ont été assignés au genre ou à la famille et 38% n'ont pas d'annotation taxonomique (Figure 26).

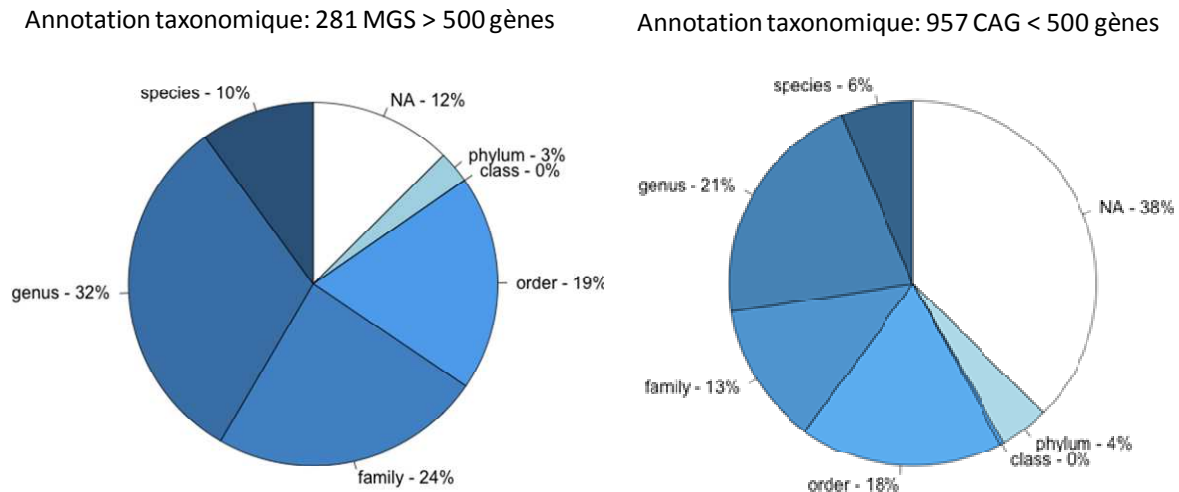


Figure 26 : Annotation taxonomique des MGS/CAG. 10% des MGS (cluster de plus de 500 gènes) ont une assignation au niveau de l'espèce et 6% des CAG (cluster de moins de 500 gènes) ont une assignation au niveau de l'espèce.

8.10. Recherche des différences d'abondances de gènes entre les groupes de souris R et NR

La recherche des gènes différentiellement abondants entre répondeurs et non répondeurs avant et après régime hyperlipidique s'est faite en utilisant le test Wilcoxon. Les gènes contrastés ont été sélectionnés sur la valeur de leur $p\text{-value} < 0,05$. Nous avons donc effectué 4 types d'analyses :

- Comparaison NR *vs* R avant régime hyperlipidique (t0)
- Comparaison NR *vs* R après régime hyperlipidique (tend)
- Comparaison NR avant régime hyperlipidique (t0) *vs* NR après régime hyperlipidique (t0)
- Comparaison R avant régime hyperlipidique (t0) *vs* R après régime hyperlipidique (tend)

8.11. Fonctions des gènes

L'ensemble des gènes sont projetés sur les clusters fonctionnels (KEEG et COG). L'ensemble des clusters sont ensuite testés pour savoir si il existe une différence de représentativité entre les groupes répondeurs et non répondeurs ($p < 0,05$) ou avant et après régime hyperlipidique (Tableau 7). Sur ce tableau est montré à titre d'exemple quelques fonctions différenciellement représentés entre R et NR avant administration du régime hyperlipidique.

row.names	size	p.NR_R.t0	q.NR_R.t0	status.NR_R	name_or_fur	description
bactNOG229	1	1,2E-03	0,982	R.t0	L	DNA polymerase III, epsilon subunit
K12141	13	1,7E-03	0,982	R.t0	hyfF	hydrogenase-4 component F [EC:1.-.-.-]
COG4990	37	2,1E-03	0,982	R.t0	S	Uncharacterized protein conserved in bacteria
NOG68413	2	2,2E-03	0,982	R.t0	NA	
NOG11725	9	2,3E-03	0,982	NR.t0	S	
firmNOG074	1	3,2E-03	0,982	R.t0	S	
NOG119216	40	3,7E-03	0,982	R.t0	S	
NOG44341	9	4,1E-03	0,982	R.t0	S	
bactNOG039	1	4,1E-03	0,982	NR.t0	T	Methyl-Accepting chemotaxis protein
NOG272112	8	4,9E-03	0,982	R.t0	NA	

Tableau 7 : Tableau de synthèse des analyses des fonctions différenciellement représentés entre répondeurs et non répondeurs avant régime hyperlipidique. row_name : nom du cluster fonctionnel, size : nombre de gènes dans le cluster, p.NR_R.t0 : pvalue du test entre répondeur et non répondeur avant régime hyperlipidique, q. NR_R.t0 : qvalue du test entre répondeur et non répondeur avant régime hyperlipidique, status.NR_R : R.t0 : la fonction est plus représentée chez les souris répondeuses, NR.t0 : la fonction est plus représentée chez les souris non répondeuses. name_or_function_description : description de la fonction du cluster ou codage à une lettre si elle est disponible.

9. Métabolomique

La préparation des échantillons ainsi que leurs analyses ont été effectuées en collaboration avec Jean-Charles Martin et Christian Ginies au sein de l'UMR 1260 NORT (Nutriton, Obésité et Risque Trombique), INRA, Université Aix-Marseille.

La métabolomique permet de cribler de façon non sélective des milieux biologiques afin de révéler et de distinguer les métabolites en présence. La teneur des métabolites présents dans un système biologique fournit ainsi une information sur la réponse d'un système biologique à des stimuli environnementaux, des pathologies ou les interactions entre le microbiote intestinal et son hôte.

La mise en œuvre d'une analyse métabolomique requiert l'utilisation de plateformes analytiques capables de détecter des centaines de métabolites à la fois. Il s'agit principalement d'instruments à base de spectrométrie de masse ou de résonance magnétique nucléaire. Les appareils de spectrométrie de masse sont le plus fréquemment couplés à des systèmes chromatographiques (liquide ou gazeux) afin d'obtenir une résolution optimale des métabolites présents dans les matrices biologiques complexes. Chaque instrument possède ses avantages et inconvénients. Aucun ne permet de détecter l'ensemble des métabolites présents dans une matrice biologique donnée, de sorte qu'il est souvent nécessaire d'utiliser deux instruments en combinaison. En effet, aucune machine n'est capable d'analyser l'ensemble du spectre métabolique, en raison de l'hétérogénéité physico-chimique et de la gamme dynamique de concentrations des petites molécules présentes dans les milieux biologiques. A l'exception des instruments de GCMS, une des difficultés de cette approche réside dans l'identification à grande échelle des métabolites détectés, faute de banques de données suffisantes et adaptées aux instruments. (Kell 2004). Enfin, il existe également des problèmes de reproductibilité et de standardisation inter-plateformes.

Une expérience d'analyse métabolomique débute par un protocole expérimental approprié afin de veiller à ce que les données soient par la suite biologiquement interprétables. L'analyse commence par le traitement des échantillons biologiques avant l'injection dans le système analytique. Les profils métaboliques obtenus (données brutes) sont ensuite traités par des logiciels spécialisés dans la détection automatique des signaux, avant d'être analysés avec des outils statistiques. Enfin, l'identification des signaux discriminants est réalisée en combinant l'analyse de spectres, la consultation de bases de données et autres outils informatiques et mathématiques (Figure 27).

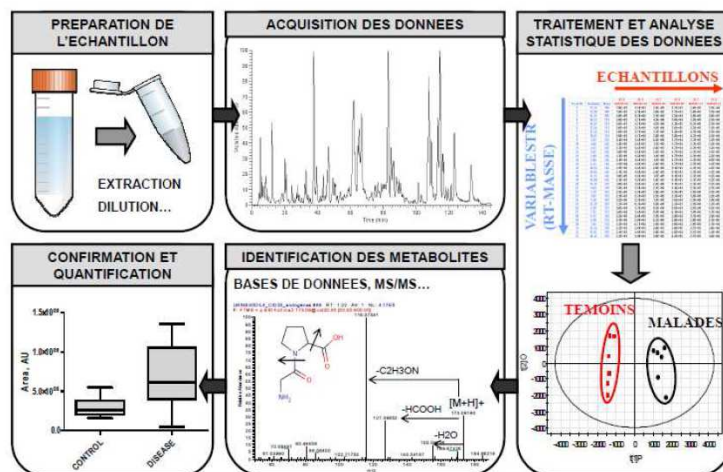


Figure 27 : Représentation schématique de la chaîne analytique en métabolomique par LC/MS. L'analyse du métabolome est une approche multidisciplinaire mettant en jeu la chimie analytique, le traitement du signal et l'analyse statistique.

9.1. Préparation des échantillons

9.1.1. Urines

Les urines des 60 souris ont été prélevées une semaine avant et douze semaines après le début du régime (cf. Figure 16). Ces échantillons ont été ensuite préparés selon le protocole adapté de Gika HG (Gika et al., 2008). Ce protocole permet l'extraction des métabolites hydrophiles et amphiphiles urinaire. Les échantillons sont centrifugés à 11000 rpm pendant 15 minutes à 4°C puis 50 µl de surnageant sont prélevés et transférés dans un tube eppendorf de 1,5 mL, auxquels on ajoute 150 µL d'H₂O Milli-Q. Les échantillons sont homogénéisés au vortex pendant 1 minute et centrifugés à 3000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. 100 µl de surnageant sont utilisés pour analyse en LC/MS et 25 µl de chaque surnageant est prélevé pour réaliser une solution représentative et qui sera utilisée comme échantillon contrôle qualité (QC) pour l'analyse LC/MS.

9.1.2. Fèces

Les fèces des 60 souris ont été prélevées une semaine avant et douze semaines après le début du régime. Ces échantillons ont été ensuite préparés selon le protocole adapté de Jansson et coll. (Jansson et al. 2009) qui permet de permettre l'extraction des métabolites hydrophiles et amphiphile fécaux. Les échantillons sont nettoyés avec du méthanol puis séchés sous flux d'azote et congelés à -80°C pendant au moins 12 heures. Les fèces sont lyophilisées pendant 24 heures. La lyophilisation permet de standardiser les conditions d'extractions, les fèces pouvant être plus ou moins hydratées. 6 mL de Tampon Phosphate Sodique à 50 mM pH 8 (378.8 mL de

Na₂HPO₄·7H₂O: 100 mM, 21.2 mL de NaH₂PO₄: 100 mM, 400 mL H₂O) sont ajoutés à 100 mg de fèces. Les échantillons sont homogénéisés au vortex et centrifugés à 200g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré et centrifugé à 18000 g pendant 10 minutes à 4°C. Les surnageants sont récupérés et 250 µl d'une solution d'eau (comportant 1% d'acide formique par mL de surnageant récupéré) sont ajoutés et le pH est ajusté à 4,5.

Les eaux fécales sont ensuite purifiées sur colonne SPE (Solid Phase Extraction) (JT Baker ref : 7090-01). L'extraction sur colonne SPE permet d'adsorber les composés à extraire sur une phase stationnaire contenue dans une cartouche (de la forme d'un corps de seringue) puis de les récupérer lors de l'élution. L'extraction sur colonne SPE permet notamment de désaliniser et déprotéiniser les échantillons. Cette méthode permet ainsi de purifier et de concentrer les échantillons avant leur analyse. Toutes les étapes de passage des différents liquides sur colonnes se font par aspiration sous vide. Les colonnes sont conditionnées avec 2 mL de méthanol puis 2 mL d'eau contenant 0,1 % d'acide formique. 0,5 mL d'échantillon est déposés par colonne. Les colonnes sont lavées avec 0,5 mL d'eau contenant 0,1% d'acide formique, puis les métabolites fixés sur les colonnes sont élués avec 0,5 mL de méthanol.

9.1.3. Plasma

Les échantillons sanguins prélevés une semaine avant et douze semaines après on été centrifugés à 3500 rpm à 4°C pendant 10 minutes. La fraction surnageante correspondant au plasma a alors été prélevée. 50 µl de plasma sont prélevés et mis dans un tube eppendorf de 2 mL dans lequel sont ajoutée 600 µl de méthanol froid afin de précipiter les protéines. Les échantillons sont homogénéisés sans usage du vortex pendant environ 1 minute, puis placés à -20°C. Après 30 minutes à -20°C, les échantillons sont agités au vortex pendant 30 secondes et centrifugés à 11000 rpm pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et mis dans un tube eppendorf muni d'un filtre 10 kDa, afin d'éliminer les protéines résiduelles, puis centrifugé à 11000 rpm pendant 45 minutes à 4°C. L'éluat est séché sous flux d'azote et l'extrait sec est repris dans 250µl d'eau mili-Q-Acétonitrile dans un rapport 1/1 + 0,1% d'acide formique. Ce protocole permet de permet l'extraction des métabolites hydrophiles et amphiphile fécaux Les échantillons sont agités une nouvelle fois au vortex pendant 1 minute et centrifugés à 11000 rpm pendant 45 minutes à 4°C. On prélève 40µl de surnageant que l'on transfère dans un vial muni d'un insert. Les échantillons de plasma ont ensuite été analysés en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC ultra-haute pression Dionex UltiMate 3000) couplée à un spectromètre de masse à ultra-haute résolution à trappe orbitale (modèle Q-Exactive plus, Thermo-scientifique).

9.2. HPLC-LC/MS

Les échantillons d'urines, de fèces et de plasma ont été ensuite analysés en chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC Agilent 1200 RRLC²⁷) couplée à un spectromètre de masse (Brüker micro TOF ESI-hybrid quadrupôle-time of flight mass spectrometer (Wissembourg, France) pour les échantillons d'urine et de fèces ; et Thermo Fisher Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass pour les échantillons de plasmas.

La HPLC sépare les métabolites par chromatographie sur colonne. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire (colonne chromatographique). La phase mobile est poussée sous haute pression à travers la colonne. Le mélange à analyser est injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire. En sortie de colonne le soluté est alors élué dans le spectromètre de masse (Figure 28).

La chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse est aujourd'hui devenue une méthode de choix pour l'analyse du métabolome. En effet, en plus d'être une technique d'analyse à haut-débit, elle est d'une très grande sensibilité et permet de séparer des molécules isobares (deux noyaux de même masse mais de charge différente), de limiter la suppression d'ionisation et le bruit de fond, et contrairement à la GC/MS, elle présente l'avantage d'être applicable à l'analyse de composés non volatiles et/ou thermosensibles (Bowers et al., 1996). Par ailleurs, la LC/MS autorise, la plupart du temps, peu ou pas d'étape de traitement de l'échantillon. Enfin, contrairement aux études en GC/MS, les sources et les analyseurs utilisés en LC/MS permettent d'obtenir la masse moléculaire monoisotopique d'un métabolite, ce qui permet de calculer sa composition chimique, et de réaliser ensuite des expériences complémentaires de fracturation moléculaire (MS/MS, MSn) afin d'affiner et/ou de confirmer son identification.

²⁷ http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/1200SeriesRRLC-OptimizeGuide_ebook.pdf

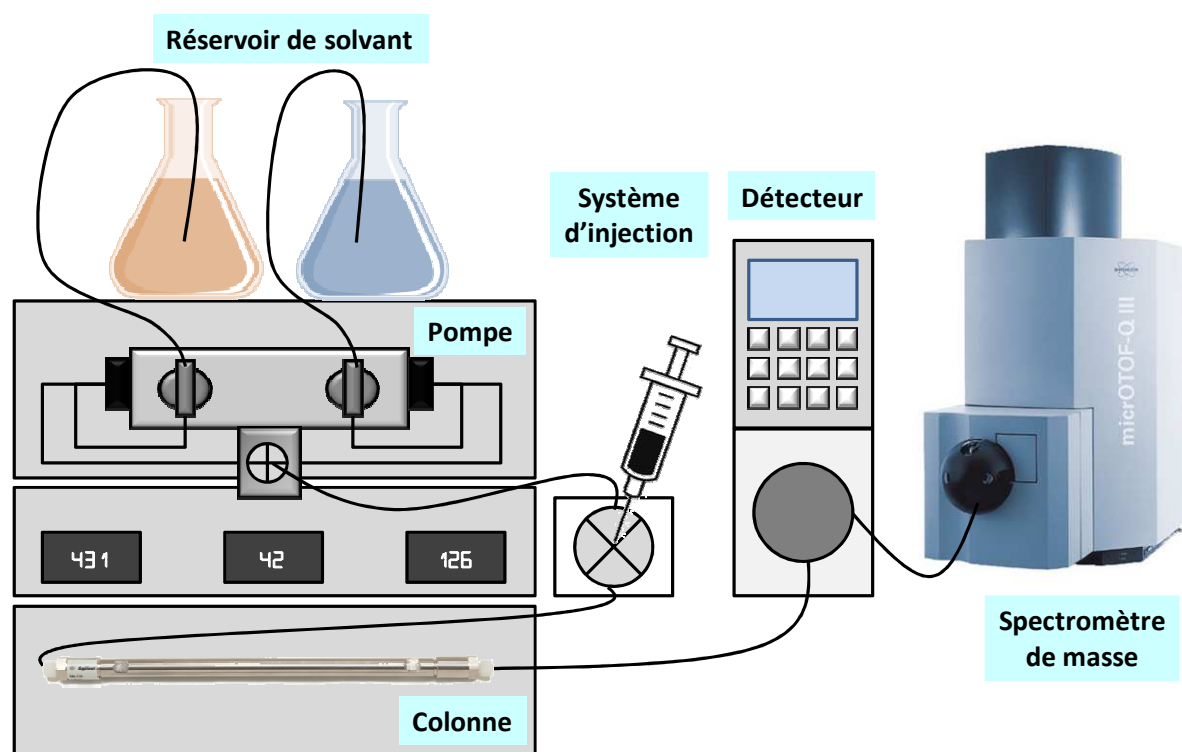


Figure 28 : Schéma d'un montage LC (HPLC)-MS. La phase mobile est poussée sous haute pression à travers la colonne. Le mélange à analyser est alors injecté puis transporté au travers du système chromatographique. Les composés en solution se répartissent alors suivant leur affinité entre la phase mobile et la phase stationnaire et sont alors élués dans le spectromètre de masse.

Nous avons utilisé ici la chromatographie à polarité de phase inversée où les métabolites se lient à la colonne par des interactions hydrophobes en présence d'un solvant polaire (ici un gradient eau-acétonitrile) et sont ensuite élués par un solvant de plus en plus hydrophobe (ou apolaire) (ici l'acétonitrile). L'élution débute par une phase mobile très polaire (très riche en eau) afin de retenir les solutés sur la phase stationnaire puis on diminue graduellement la polarité de la phase mobile (augmentation de la proportion de solvant organique) pour accroître la force éluante. Les composés polaires sont donc élués avant les composés apolaires. Une fois élués de la colonne, les métabolites pénètrent dans le spectromètre de masse où ils sont débarrassés du solvant puis ionisés par électro-nébulisation.

9.3. MS ESI-TOF

La spectrométrie de masse est une méthode d'analyse permettant de détecter et d'identifier des molécules d'intérêt (ici des métabolites) par mesure de leur masse, et de caractériser leurs structures chimiques. Son principe réside dans la séparation de molécules chargées en fonction de leur rapport masse/charge (m/z). Les différentes phases de la spectrométrie de masse peuvent se résumer en trois grandes étapes : l'ionisation des molécules d'intérêts, le tri des molécules ionisées au sein du (ou des) analyseur(s) successif(s), et la détection des ions par mesure des valeurs du rapport m/z (Figure 29).

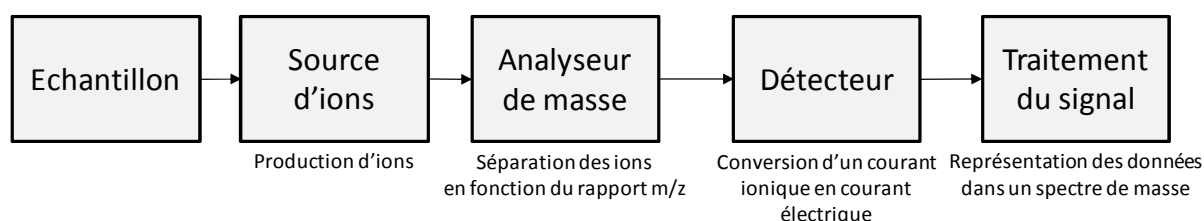


Figure 29 : Schéma des séquences d'un passage machine en spectrométrie de masse. Fondamentalement, un spectromètre de masse est composé des éléments suivants : un système d'introduction de la substance à analyser, une source pour ioniser les analytes, un ou plusieurs analyseurs pour séparer les différents ions générés dans la source, un détecteur pour dénombrer les ions et enfin, un système de traitement des données permettant la visualisation et l'enregistrement des spectres de masse et le contrôle des paramètres d'acquisition.

La technique de production d'ions utilisée ici est l'Electrospray Ionisation (ESI) ou Ionisation par électro-nébuliseur. Cette technique, développée par J.B. Fenn dans les années 1980 (Fenn et al., 1989; Fenn et al, 1990) est utilisée en spectrométrie de masse pour produire des ions à partir de composés en solution. L'électrospray est produit par application, à pression atmosphérique, d'un fort champ électrique sur un liquide traversant un tube capillaire avec un faible débit. Le champ électrique est obtenu par application d'une différence de potentiel entre ce capillaire et une contre-électrode. Il provoque l'accumulation de charges à la surface du liquide, situé à l'extrémité du capillaire, qui va se rompre pour former des gouttelettes fortement chargées. L'évaporation du solvant contenu dans ces gouttelettes va provoquer la réduction de leur taille et provoquer leur explosion. Les ions ainsi produits sont accélérés vers l'analyseur alors que les molécules non chargées sont éliminées (Figure 30).

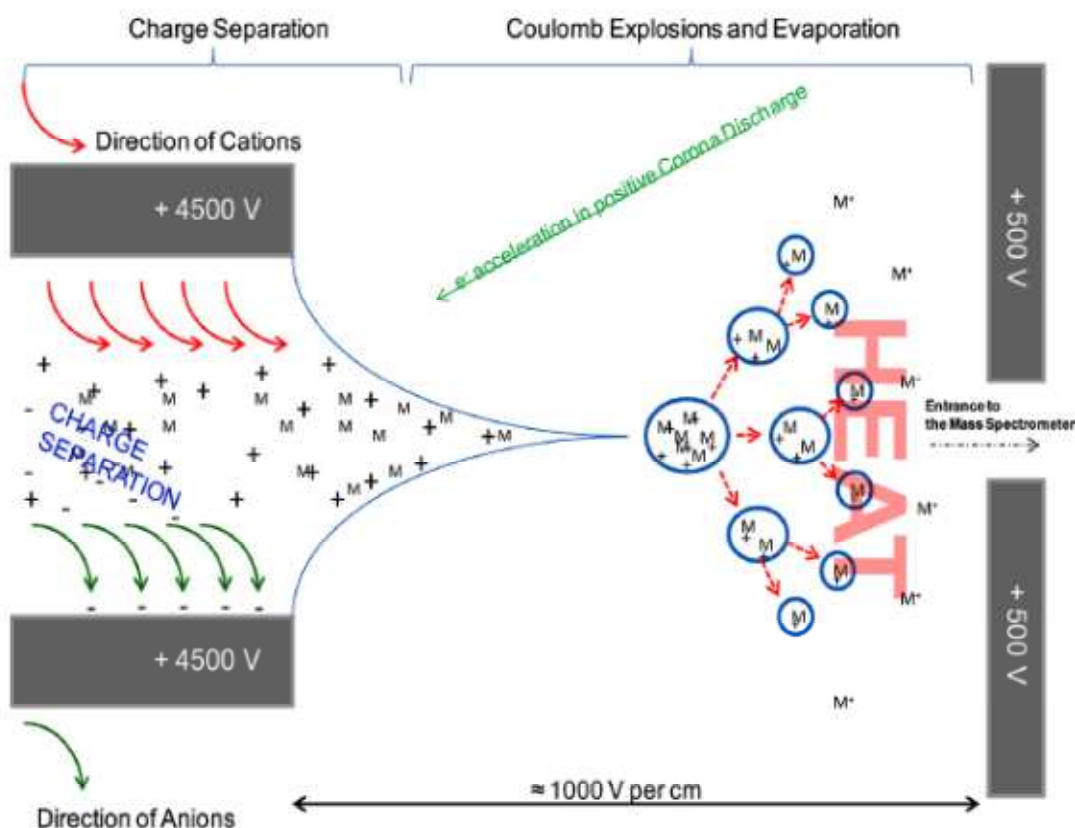


Figure 30 : Représentation schématique de l'électro-nébuliseur (ESI). L'électrospray est produit par application d'un fort champ électrique sur un liquide contenant les molécules d'intérêts. Les gouttelettes de solutés sont formées à l'extrémité d'un fin capillaire porté à un potentiel élevé. Ce champ électrique provoque une accumulation de charges à la surface du liquide en sortie du capillaire, ce qui va induire la formation de fines gouttelettes hautement chargées et provoquer l'évaporation du solvant. Cela conduit au rétrécissement de la taille des gouttelettes jusqu'à ce que le champ électrique à leur surface soit suffisant pour provoquer la désorption des ions : les ions se détachent des gouttelettes de solvant.

Les analyseurs utilisés ici sont un analyseur quadrupôle associé à un analyseur à temps de vol (Q-TOF). Le quadrupôle est constitué de quatre électrodes parallèles. Les électrodes opposées sont reliées entre elles et soumises au même potentiel tandis que les électrodes adjacentes sont portées à des potentiels de même valeur, mais opposés. Une fois produits par ESI, les ions sont introduits et séparés au sein de ce quadrupôle en fonction de la stabilité de leur trajectoire à travers le champ électrique oscillant appliqué sur les tiges. Seuls les ions possédant un certain rapport masse/charge atteindront l'analyseur à temps de vol, les autres seront déviés sur les tiges. En faisant varier les valeurs de la tension appliquée, on sélectionne alors une gamme d'ions possédant une gamme de rapport masse/charge et le quadrupôle se comporte comme un filtre de masse (Figure 31).

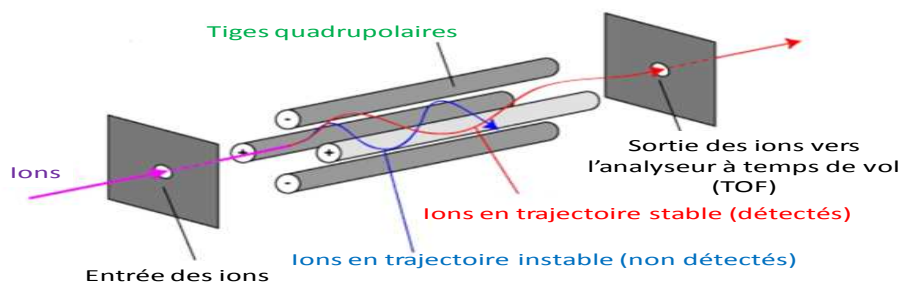


Figure 31 : Représentation schématic d'un quadrupôle en spectrométrie de masse

Une fois passé par le quadrupôle, les ions sont dirigés vers l'analyseur en temps de vol (TOF). Les ions sont alors accélérés vers le tube de vol par une différence de potentiel appliquée entre une électrode et une grille d'extraction. Les particules accélérées ayant toutes la même énergie cinétique passent ensuite dans le tube de vol, libre de champ, où elles sont séparées en fonction de leur vitesse acquise (Figure 32). Les vitesses sont inversement proportionnelles à la racine carrée de leurs rapports m/z . Ainsi, pour des ions de même énergie cinétique, les ions plus légers possèdent une grande vitesse et arrivent au détecteur plus rapidement que les ions plus lourds possédant une plus faible vitesse. Les analyseurs à temps de vol sont des analyseurs de choix en métabolomique en raison de leur sensibilité et de leur pouvoir de résolution en masse, notamment par couplage avec des quadripôles (Q-TOF) (Major et al., 2006; Williams et al., 2006).

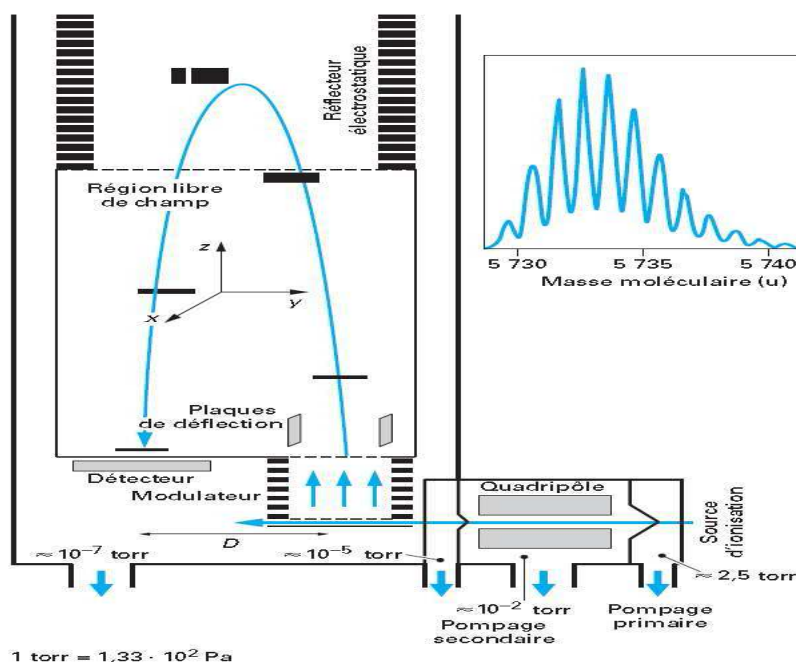


Figure 32 : Principe de fonctionnement d'un analyseur à temps de vol. On mesure le temps mis par une particule chargée pour atteindre un détecteur situé à une distance connue. Ce temps dépendra du rapport masse/charge de la particule considérée. Ce sont les particules les plus lourdes qui seront accélérées aux vitesses les plus basses et les particules les plus légères qui sont accélérées aux vitesses les plus hautes. La détermination du rapport masse/charge découle de ce temps de vol et de la connaissance des autres paramètres expérimentaux comme la position du détecteur et la tension d'accélération.

L'autre appareil MS utilisé pour l'analyse du plasma est un spectromètre de masse hybride comprenant comme le « QTOF » des quadripôles pour sélectionner les ions, mais où le détecteur

est constitué d'une trappe orbitale et non plus d'un analyseur en temps de vol. Le principe est de piéger les ions dans un champ magnétique, où ils acquièrent une trajectoire à la fois orbitale et transrionnelle. La cinétique du mouvement de circulation des ions et sa décroissance sont analysées par une transformée de Fourier, dont la forme est directement associée au rapport m/z de l'ion considéré. (Figure 33) Ce type d'appareil Orbitrap possède un pouvoir résolutif supérieur au QTOF (ici, x15 en théorie, x7 en pratique).

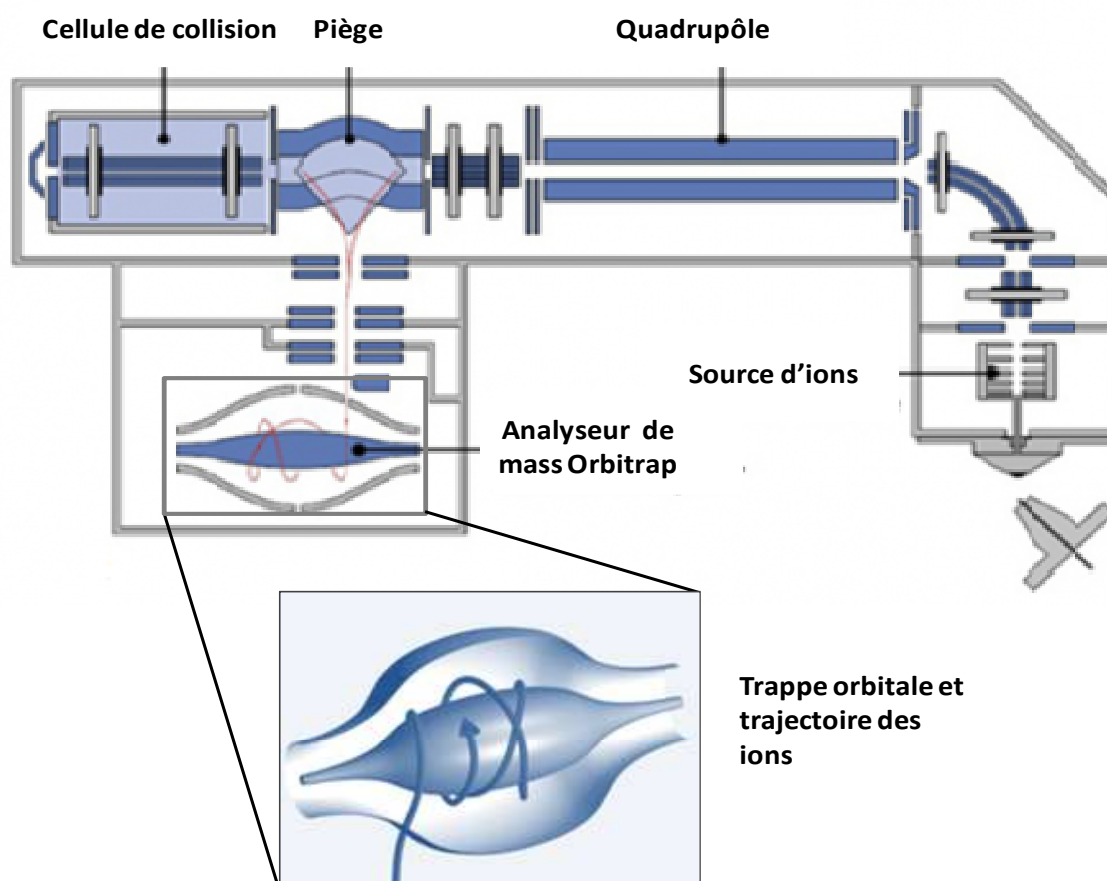


Figure 33 : Appareil hybride quadrupole/trappe orbitale (type Q-Exactive). Le principe de l'Orbitrap : Les ions sont injectés dans l'espace séparé par deux électrodes de forme géométrique parfaitement définie. Suivant son rapport masse/charge, l'ion va osciller autour de l'électrode centrale avec une fréquence caractéristique. La mesure de cette fréquence permet d'atteindre une grande précision et de séparer des ions de masses très proches.

9.4. Paramètres HPLC

Un volume de 5 µL de chaque échantillon a été injecté sur le système chromatographique et a été élué dans les conditions de gradient définis dans le Tableau 8 avec des phases mobiles composées d'eau et d'acétonitrile contenant chacune 0,1% d'acide formique (Tableau 9).

Paramètre	Valeur
Solvant A	Eau (H ₂ O) + 0,1 % Acide Formique (HCOOH) + 10 mM Ammonium Formate (HCOONH ₄)
Solvant B	Acetonitrile (ACN) + 0,1 % Acide Formique (HCOOH) + 10 mM Ammonium Formate (HCOONH ₄)
Débit	0,4 mL/min
Température	40°C
Température d'autosampler	4°C
Volume d'injection	5 µL
Colonne utilisée	Nucleodur C18 Pyramide (150 mm x 2 mm x 1.8 µm)

Tableau 8 : Composition des solvants et paramètres utilisés en HPLC inverse.

Fèces	Min	A (% H ₂ O)	B (% Acétonitrile)
	0	97	3
	1	97	3
	8	70	30
	9	5	95
	10	5	95
	11	97	3
	15	97	3

Urine	Min	A (% H ₂ O)	B (% Acétonitrile)
	0	97	3
	1	97	3
	2	70	30
	10	3	97
	13	3	97
	15	97	3

Tableau 9 : Représentation du gradient eau-acétonitrile utilisé en HPLC inverse en fonction du temps.

Les échantillons ont été analysés de manière aléatoire dans le système LC-MS. La séquence d'analyse commence par 4 blancs afin de stabiliser le système d'analyse, suivie d'une première série de huit échantillons de contrôle qualité permettant de stabiliser le système chromatographique. Les échantillons biologiques sont ensuite analysés en une seule série, interrompue tous les cinq échantillons expérimentaux par un échantillon de contrôle qualité.

9.5. Paramètres MS

Avant l'analyse, le spectromètre de masse Q-TOF a été étalonné avec une solution d'acétate de sodium (gamme de m/z de 91 à 1122 effectuée automatiquement au début de chaque analyse, calibration utilisant une équation quadratique, avec 32 masses/charge de référence, permettant une précision de calibration de plus de 90 % avec une fenêtre de masse de 0,001 %. Les conditions d'acquisition étaient les suivantes : mode « full scan » balayant les m/z de 50 à 1500 à 1 scan/sec, voltage capillaire (kV), 4,5, température capillaire, 250°, énergie de la cellule de collision réglée à 10eV, voltage du cône, 40V, flux du gaz d'assèchement, 9,5 L/min, pression du gaz de nébulisation à 2,4 bar. L'acquisition a été réalisée en mode d'ionisation positive ; la résolution était de 7000 à 200 uma.

Pour l'analyse du plasma par spectrométrie Q-Exacte, les réglages de l'appareil sont détaillés dans le tableau ci-dessous (Tableau 10); les acquisitions étaient réalisées simultanément en mode positif et négatif (ce qui n'est pas possible avec le QTOF) :

Paramètre (mode “switching polarity”)	Valeur mode POS	Valeur mode NEG	Paramètre	Valeur mode POS	Valeur mode NEG
Spray voltage	3500 V	-3500 V	Résolution (pour m/z 200 théorique)	70 000	70 000
Capillary temperature	320°C	320°C	Microscans	1	1
Sheath Gas flow rate	30	30	Scan rate (scan/sec)	4	4
Auxiliary Gas flow rate	8	8	Inject time (ms)	250	250
Auxiliary temperature	310°C	310°C	Mass range (m/z)	80-1000	80-1000
S-lens RF	55 V	55 V			
Lock mass	391.28429				

Tableau 10 : Paramètres du Q-Extractive.

9.6. Prétraitement des données (Filtration et détection des pics entre échantillons)

De manière générale, le traitement des données débute par une étape de soustraction du bruit de fond spectral. Les signaux sont ensuite extraits, alignés et restitués sous la forme d'une matrice contenant des variables, identifiées par un rapport masse/charge (m/z), une intensité et un temps de rétention, et des numéros échantillons. Les valeurs contenues dans la matrice correspondent aux aires ou aux abondances de chaque pic (défini par un temps de rétention et un m/z) pour chacun des échantillons.

Dans un premier temps les fichiers de données brutes ont été convertis au format CDF (QTOF) et mzXML (Q-Exactive). Le traitement des données a ensuite été réalisé avec le package XCMS « various forms (X) of Chromatography Mass Spectrometry » (Bioconductor version 2.8) fonctionnant avec la plateforme logiciel R (version utilisée 2.11.1). XCMS (Smith et al. 2006) permet d'effectuer d'abord un filtrage des données afin d'éliminer le bruit de fond, puis une détection des pics par déconvolution²⁸ suivie d'un alignement des pics détectés. La stratégie de traitement des données mise en œuvre par XCMS combine plusieurs étapes (Figure 34). Cette stratégie est modulaire et permet la substitution ou l'ajout d'étapes de traitement supplémentaires (comme par exemple avec le package CAMERA permettant de calculer les isotopes et adduits théoriques issus d'un même métabolite).

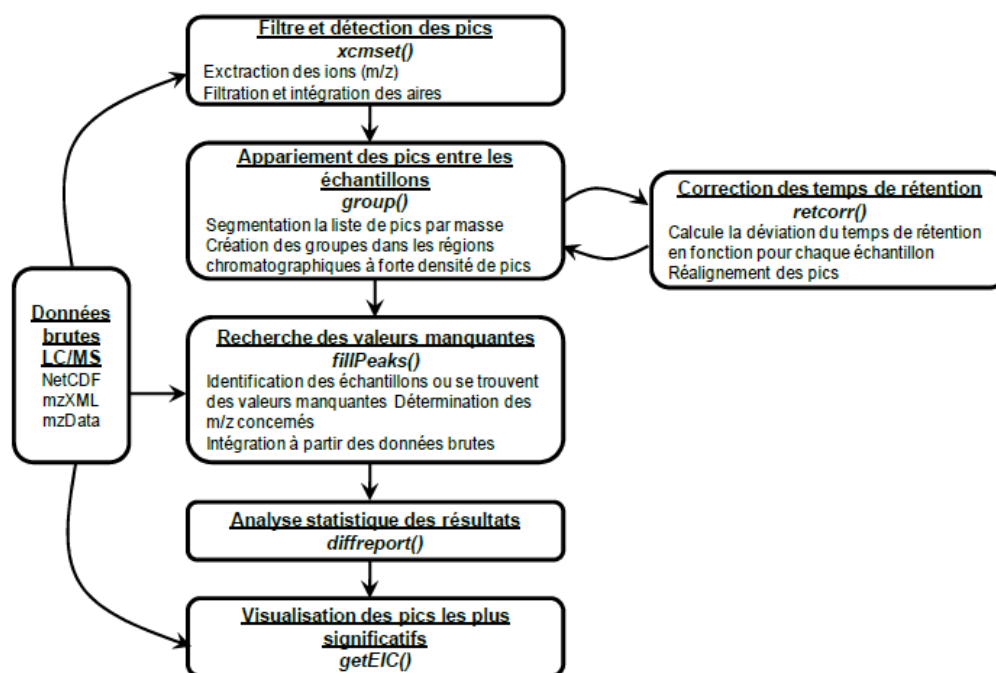


Figure 34 : Flux de traitements de données mis en œuvre par XCMS. 5 grande étapes d'analyse : détection des pics, appariement des pics, recherche de valeurs manquantes, analyse statistique et visualisation des pics.

Après identification des pics, ceux représentant un même métabolite dans les échantillons sont regroupés. En effet, l'ionisation par électro-nébulisation, si elle est peu destructrice, est

²⁸ La déconvolution est une opération informatique permettant d'extraire les ions séparément.

capable d'engendrer à partir de la même molécule des ions de natures différents (adduit sodium, potassium, adduit nitrile, forme déshydratée, forme décarbonée ou désaminée, etc...). Le package CAMERA est capable de reconnaître ces différentes formes issues d'une même molécule parent et de l'étiqueter comme telle. L'ensemble des pics sont ensuite comparés entre les différents échantillons pour permettre le calcul et la correction des dérives associées aux temps de rétention ainsi que la comparaison de leurs intensités relatives. La méthode « centWave » (Tautenhahn et al. 2008) a été utilisée pour la détection des signaux, et la méthode « obi-warp » a été utilisée pour l'alignement des temps de rétention des pics. La qualité des pics est évaluée à partir des échantillons contrôle qualité qui rapportent la fiabilité analytique : pour chaque pic présent dans chacun des échantillons « QC », on calcule son coefficient de variation. Celui-ci est jugé satisfaisant si il ne dépasse pas 20% ; dans le cas contraire, le pic n'est pas retenu et est éliminé de l'ensemble des échantillons de l'analyse car jugé instable.

Comme indiqué précédemment, l'analyse MS induit une redondance d'informations en produisant à partir d'une même molécule mère un nombre variable d'ions fils (adduits et fragments). Egalement, en raison de la précision de mesure des m/z par les appareils de haute résolution, différentes formes isotopiques (une même molécule peut contenir des proportions variables de C13, S35, N15) différentes d'un écart de masse m/z de 1, 2 ou 3 peuvent également être détectées et extraite par XCMS. Le package CAMERA (Collection of Algorithms for MEtabolite pRofile Annotation) (Kuhl et al., 2012) permet en sortie de XCMS d'identifier les ions redondants. Un script R maison permet de filtrer cette redondance et de ne retenir pour chaque famille que l'ion fils dont l'intensité est la plus abondante (Figure 35).

A cette étape, les données sont projetées dans une carte d'analyse en composante principale, permettant de visualiser si la dispersion des échantillons QC est réduite et est très inférieure à la celles des échantillons biologiques. Cette inspection visuelle permet également de vérifier la présence sur les échantillons QC d'une dérive analytique, se traduisant par la dispersion des échantillons QC selon une trajectoire liée l'ordre d'injection des QC. Cette dérive est fréquente et provient de l'encrassement de la source d'ionisation par les matrices biologiques injectées, se traduisant par une atténuation générale du signal. Cette dérive lorsqu'on la constate peut être modélisée mathématiquement et corrigée, afin d'éviter de pénaliser la qualité des résultats. La part de l'intensité du signal perdu peut ainsi être calculée et corrigée pour chaque pic. Cette opération est réalisée par le serveur Web Galaxy²⁹, en utilisant des algorithmes de correction linéaire (méthode de Van der Kloet) ou non linéaire (LOESS et LOWES). La méthode linéaire a donné les meilleurs résultats sur nos jeux de données (van der Kloet et al., 2009).

²⁹ workflow4metabolomics.org

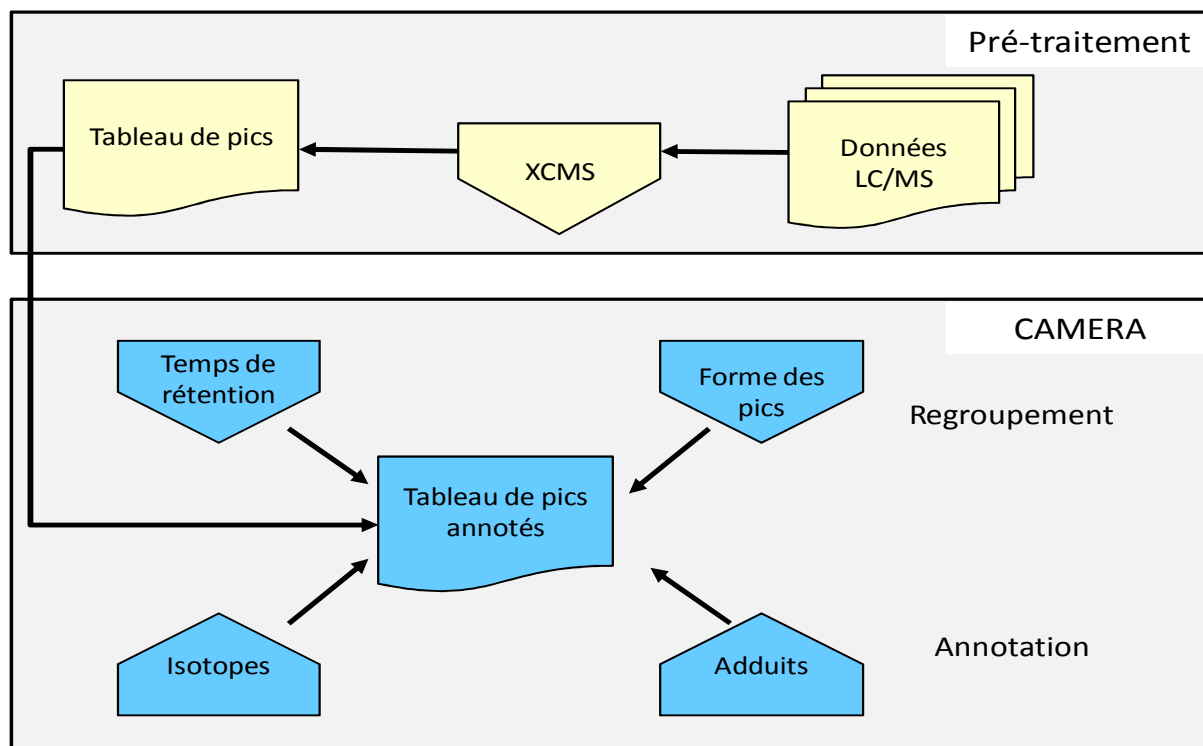


Figure 35 : Chaînage bioinformatique CAMERA pour l'analyse des données LC/MS. Les fichiers de données brutes sont prétraités avec XCMS (partie supérieure) puis les données sont ensuite analysées avec CAMERA (partie inférieure). L'étape de regroupement comprend l'intégration du temps de rétention et de la forme des pics chromatographiques. Les isotopes et les adduits sont ensuite annotés en fonction des différences de masse entre les différents ions. D'après Kuhl C, LC-MS Peak Annotation and Identification with CAMERA Analytical chemistry 2011.

9.7. Analyses des données

Les matrices générées ainsi débarrassées des artefacts et redondances comportent entre 450 et 1500 signaux. L'analyse statistique porte sur ces signaux et permet notamment d'extraire ceux qui possèdent une vertu discriminante. L'analyse de ces signaux se fait par régression PLS (Partial Least Square). La régression PLS a été conçue pour faire face aux problèmes résultants de l'insuffisance de l'utilisation de la régression linéaire classique, qui trouve ses limites dès lors que l'on cherche à modéliser des relations entre des variables d'intérêts pour lesquelles il y a peu d'individus, ou beaucoup de variables en comparaison du nombre d'individus, ou encore lorsque les variables sont fortement corrélées entre elles. Dans ce type d'analyse, on étudie deux variables quantitatives, dont l'une, appelée variable expliquée (ici le statut des souris : répondeuses et non répondeuses), est considérée comme dépendante de l'autre, appelée variable explicative (les métabolites identifiés par LC/MS). Ce type de modélisation n'utilise pas directement les variables explicatives, mais calcule d'abord les axes PLS sur lesquels sera ensuite réalisée la régression. Ces axes sont des combinaisons linéaires des variables initiales calculées de manière à décrire les plus grandes variations présentes dans le jeu de données et à maximiser la covariance entre les variables expliquées et les variables explicatives du modèle. Ces axes sont tous orthogonaux entre eux. En régression PLS, toutes les variables importantes sont conservées et les variables sans importance sont soit exclues, soit participent au modèle, mais avec un faible poids. Les variables

explicatives sont ainsi décrites en fonction des variables expliquées. Pour ce qui est de la visualisation des données, les données sont présentées, tout comme pour l'ACP, sous forme de « score plot » ou carte factorielle du poids des individus, c'est-à-dire la projection des échantillons dans le nouveau repère généré par la PLS (Figure 36).

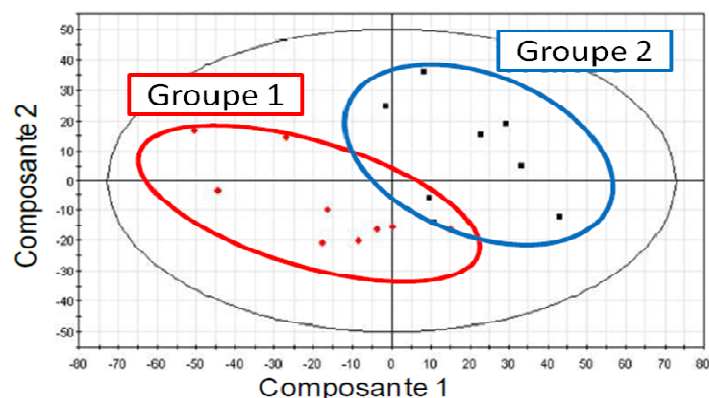


Figure 36 : Présentation des données lors des analyses multivariées. La carte factorielle du poids des individus (*score plot* en anglais) permet de visualiser la répartition des échantillons dans un espace à 2 dimensions. Les axes du graphique, encore appelés composantes principales ou variables latentes, correspondent à des combinaisons linéaires des variables d'origine (signaux issus de la LC/MS). Ces combinaisons sont calculées de façon à visualiser la séparation des deux groupes sur les premières composantes.

L'analyse discriminante PLS (PLSDA, de l'anglais « partial least square-discriminant analysis ») est une variante de la régression PLS qui permet de construire un modèle qui maximise la séparation entre les classes auxquelles appartiennent les échantillons. Elle possède les avantages de la PLS : elle peut en effet gérer un nombre important de variables, gérer les multicollinéarités et les données manquantes (Wold et al., 2002). La différence entre les deux méthodes (PLS et PLSDA) repose sur la nature des variables explicatives, pour une PLS classique les variables explicatives sont des variables quantitatives, pour la PLS-DA les variables explicatives sont qualitatives ou catégorielles.

La régression PLS, aussi bien que la PLS-DA permettent la construction d'un modèle explicatif. Ce modèle permet ainsi d'isoler les métabolites dont l'intensité est caractéristique d'un état biologique donné et qui contribuent à la séparation des différents groupes que forment les échantillons. Ce modèle construit à partir d'un jeu de données initiales peut également être utilisé pour expliquer un nouveau jeu de données. On cherche ainsi à prédire la classe d'appartenance des individus du nouveau jeu de données. Cependant les variables d'intérêt mises en évidence par les analyses statistiques multivariées ne sont identifiées que par la valeur de leur couple rapport masse/charge-temps de rétention dans le cas de la LC/MS. Il faut donc faire le lien entre ces valeurs et des métabolites afin de pouvoir les replacer dans le contexte biologique et évaluer leur pertinence.

1. Comparaison des souris contrôles et high fat

1.1. Gain de poids

Les souris du groupe contrôle ont grossi de 5,65 grammes en moyenne au cours de l'expérimentation, tandis que les souris du groupe high fat (cad l'ensemble des souris ayant reçu un régime hyperlipidique pendant 12 semaines) ont grossi de 19,98 grammes en moyenne (CONT=5,65 \pm 0,62g ; HF=19,98 \pm 4,59g ; $p=7,40.10^{-07}$). Après 12 semaines de régime, les souris du groupe high fat pèsent en moyenne 12,76 grammes de plus que les souris du groupe contrôle (CONT=27,21 \pm 1,45g ; HF=39,97 \pm 5,07g ; $p=7,43.10^{-07}$). On observe par ailleurs que l'ensemble des souris du groupe contrôle ont grossi de manière homogène tandis que les souris du groupe high fat n'ont pas toutes grossi de la même manière. Il existe un étalement des valeurs du gain de poids chez ces souris. Moins de 10% des souris grossissent de moins de 15 grammes tandis qu'environ 30% des souris prennent entre 15 et 20 grammes et qu'environ 40% prennent entre 20 et 25 grammes. Enfin, 15% prennent entre 25 et 30 grammes. La consommation alimentaire moyenne des souris high fat sur les 12 semaines de régime est 1,5 fois plus faible que celle des souris contrôles (CONT=321,2 \pm 10,9 ; HF=214,9 \pm 13,9) (Figure 37).

1.2. Efficacité alimentaire

La consommation alimentaire totale des souris high fat est nettement moindre que celle des souris contrôles (CONT=321,22 \pm 10,94 ; HF=214,92 \pm 13,92) (Figure 37).

L'efficacité alimentaire (c'est-à-dire le gain de poids divisé par la consommation alimentaire) a été calculée pour l'ensemble des souris. Les souris du groupe high fat possèdent une efficacité alimentaire 4,6 fois plus élevée que les souris du groupe contrôle (CONT=1,76% \pm 1,54 ; HF=8,14% \pm 0,16% ; $p=7,43.10^{-07}$) (Figure 37).

1.3. Poids des organes

Au bout de 12 semaines de régime, les poids du foie (CONT=0,99 \pm 0,08g ; HF=1,12 \pm 0,18g, $p=0,0014$), des tissus adipeux épидидymal (CONT=0,398 \pm 0,088g ; HF=2,64 \pm 0,74g ; $p=7,40.10^{-07}$) et inguinal (CONT=0,12 \pm 0,02g ; HF=2,67 \pm 0,80g ; $p=7,78.10^{-07}$) des souris du groupe high fat sont significativement plus élevés que ceux des souris contrôles (Figure 38).

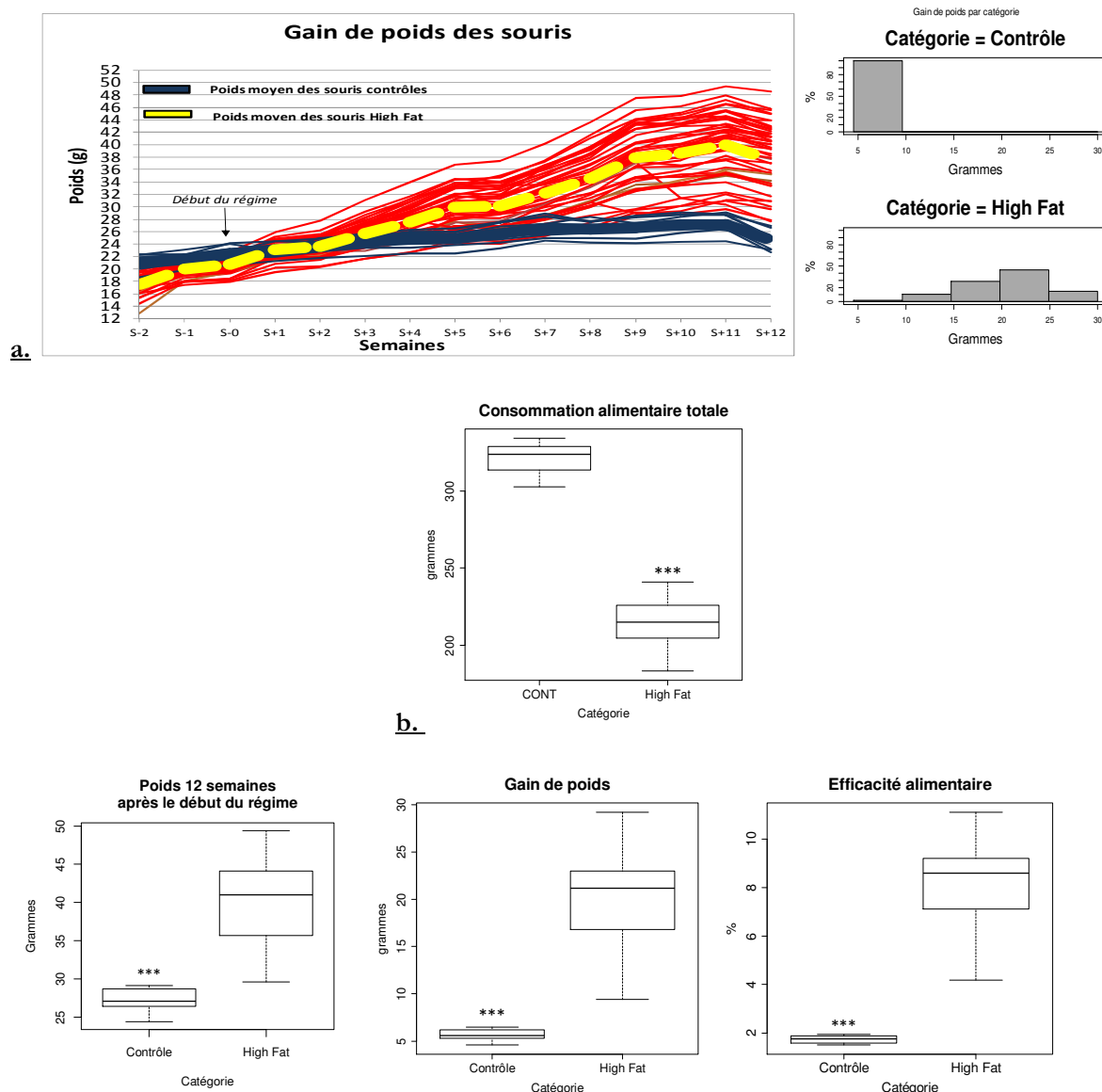


Figure 37 : Gain de poids, consommation et efficacité alimentaire. **a.** Evolution du poids des souris contrôles et des souris High Fat pendant les 12 semaines de régime. On remarque que les souris high fat prennent plus de poids que les souris contrôles. **b.** Consommation totale sur les 12 semaines de régime ($p=7,081 \cdot 10^{-7}$). **c.** Poids final ($p=7,42 \cdot 10^{-7}$), gain de poids ($p=7,40 \cdot 10^{-7}$) et efficacité alimentaire des souris contrôles et des souris high fat ($p=7,43 \cdot 10^{-11}$). $n=10$ pour les souris contrôles et $n=48$ pour les souris high fat. *** $p \leq 0,001$.

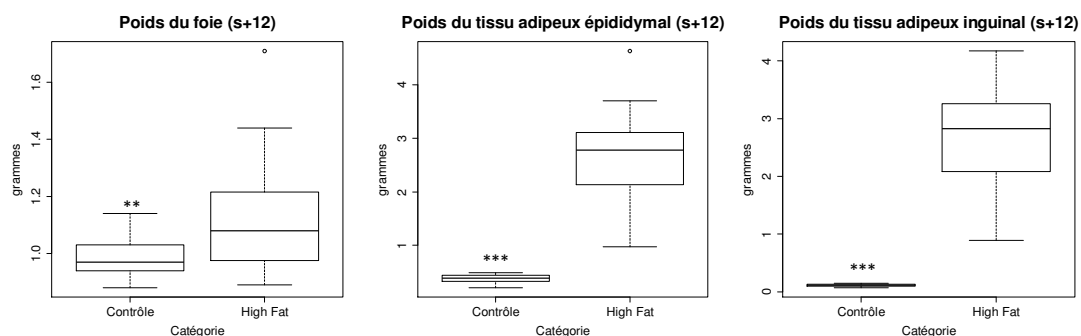


Figure 38 : Poids des différents organes mesurés au sacrifice des animaux. $n=10$ pour le groupe contrôle et $n=48$ pour le groupe high fat. *** $p \leq 0,001$.

1.4. Glycémie et test de tolérance au glucose (OGTT)

La glycémie à jeun des souris CONT est inférieure à celle des souris HF (CONT=164,65 \pm 15,40mg/dl ; HF=187,75 \pm 24,06) ; $p=2.10^{-03}$). Les souris HF sont donc hyperglycémiques par rapport aux souris CONT. De plus, l'aire sous la courbe (ASC) calculée sur la base des dosages glycémiques effectués au cours du test montre que les souris HF présentent une moins bonne tolérance au glucose que les souris du groupe contrôle. Les souris du groupe high fat ont une ASC moyenne de 42375 mg/dl.min tandis que les souris du groupe contrôle ont une ASC moyenne de 34956 mg/dl.min (CONT=34956 \pm 5752,4 mg/dl.min ; HF= 42375 \pm 3480,7 mg/dl.min ; $p=1,7.10^{-04}$) (Figure 39).

1.5. Comparaison des souris contrôles et des souris high fat

Une analyse en composante principale (ACP), prenant en compte les souris CONT et HF a été effectuée sur la base de l'ensemble des critères cités ci-dessus, à savoir : le gain de poids des souris, l'efficacité alimentaire, le poids du foie, le poids du tissu adipeux épididymal, le poids du tissu adipeux inguinal et le test de tolérance au glucose.

La projection de l'ensemble des individus sur l'ACP nous montre que les souris soumises à un régime contrôle sont exclusivement et négativement corrélées à l'axe 1 tandis que les souris soumises à un régime hyperlipidique se situent de part et d'autres de ce même axe (Figure 40). Ainsi, l'ensemble des individus contrôles reste regroupé à l'extrémité gauche du graphique tandis que les individus soumis à un régime hyperlipidique sont très étalés sur l'axe 1 et de part et d'autre de l'axe 2. Ces individus répondent donc de manière contrastée à un même régime hyperlipidique.

Par ailleurs, la représentation des variables sur le cercle de corrélation indique que les axes 1 et les axes 2 expliquent 88.7 % (78.73 % + 9.94 %) de la variabilité totale (Figure 41). De plus, le poids des tissus adipeux, le gain de poids et l'efficacité alimentaire contribuent majoritairement à la formation de l'axe 1 (TA=18,94%, TI=20,17%, GP=20,37%, EA=19,73) (Figure 41). Le poids du foie et l'intolérance au glucose contribuent à la formation de l'axe 2 pour 24,6% et 73,1% respectivement. Cependant, la variable « poids du foie » n'est pas bien projetée sur le cercle de corrélation avec un \cos^2 de 0,655 tandis que les autres variables ont un \cos^2 supérieur ou égal à 0,89 (Gain de poids : 0,97 ; Efficacité alimentaire : 0,93 ; Tissu adipeux épididymal : 0,89 ; Tissu adipeux inguinal : 0,95 ; ASC : 0,91). Le \cos^2 des variables représente leur qualité de représentation et de projection sur les axes (c'est un indice de non déformation des distances projetées). Une bonne projection se situant aux alentours d'une valeur de \cos^2 de 0,90. Il en découle que la variable « Foie » est une variable mal projetée et dont la qualité de représentation n'est pas idéale. On ne peut donc pas conclure que cette variable participe de manière significative à la construction des axes de l'ACP et que donc le poids du foie, dans cette analyse, n'est pas un critère permettant de discriminer correctement les souris high fat des souris contrôles.

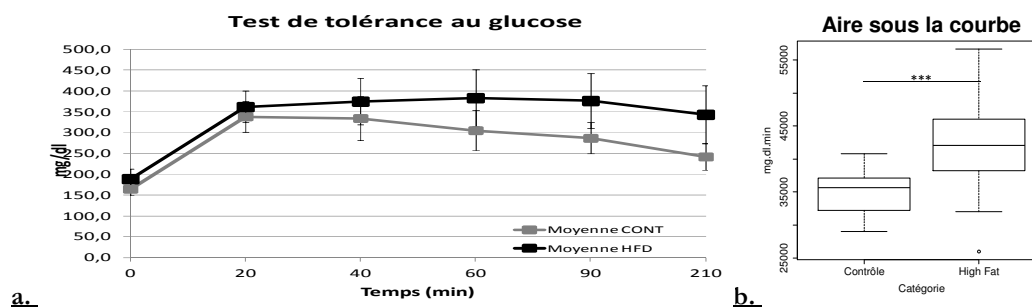


Figure 39 : Glycémie et OGTT. a. Glycémie en fonction du temps au cours de l'OGTT. b. Aire sous la courbe.

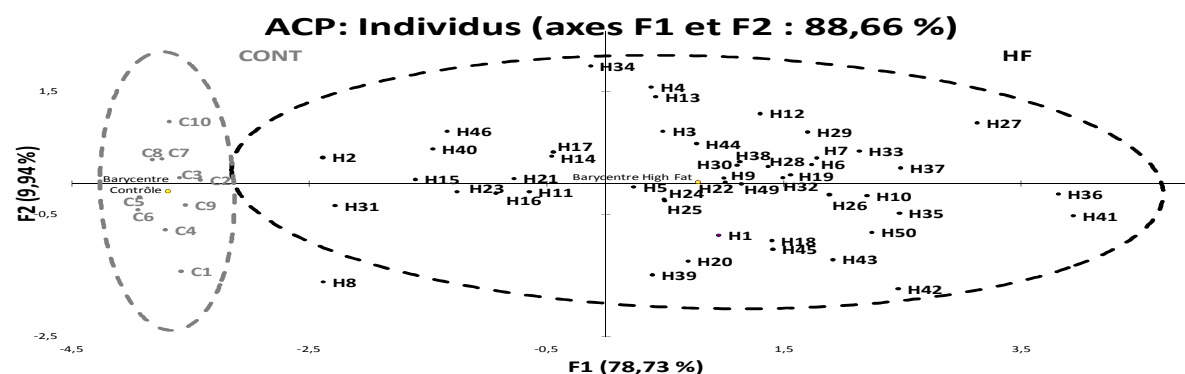


Figure 40 : Analyse en composante principale (ACP) des souris CONT et HF. Représentation des individus HF et CONT sur les deux premiers axes propres de l'ACP. L'ensemble des souris soumises au régime contrôle sont négativement corrélées à la construction de l'axe 1, tandis que les souris soumises au régime hyperlipidique se répartissent de part et d'autre de cet axe. Certaines sont positivement corrélées aux variables participant à la construction de l'axe 1 et d'autres sont négativement corrélées à la construction de cet axe. Les ellipses noires et grises matérialisent les ellipses de confiances pour chaque catégorie.

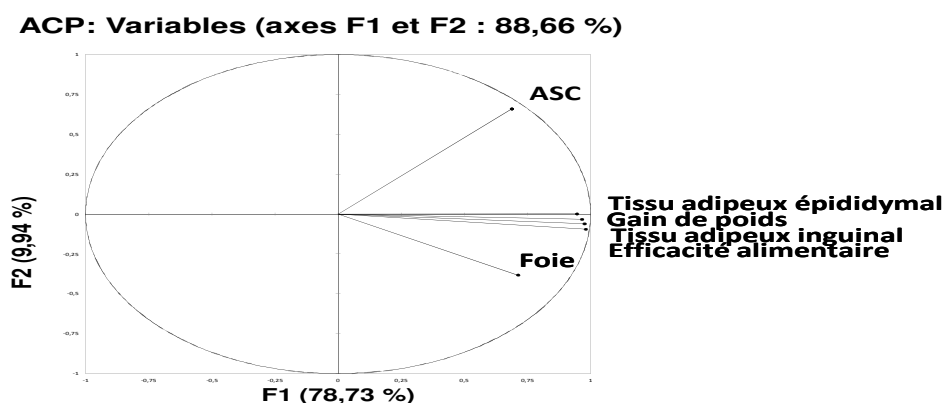


Figure 41: ACP : Représentation des variables sur les deux premiers axes propres de l'ACP. Le poids des tissus adipeux, le gain de poids et l'efficacité alimentaire contribuent majoritairement à la formation de l'axe 1 (TE=18,94% ; TI=20,17% ; GP=20,37% ; EA=19,73)

1.6. Choix des souris répondeuses et non répondeuses

Nous avons alors réalisé une seconde ACP sur l'ensemble des souris soumises à un régime hyperlipidique tout en gardant les mêmes critères de sélection (Figure 42). Les deux premiers axes propres de cette ACP expliquent 86.9% de la variabilité totale. L'ensemble des variables contribuent majoritairement à la formation de l'axe 1 exceptée la variable « ASC » qui contribue à la formation de l'axe 2 pour 91 % (Figure 42). Nous constatons par ailleurs que la variable « ASC » est en partie indépendante des autres critères (une indépendance totale serait avérée si l'angle formé entre la variable « ASC » et les autres variables était de 90°). Il en résulte que l'intolérance au glucose et l'obésité ne sont pas forcément corrélées entre elles. Ainsi une souris ayant une valeur d'ASC élevée ne sera pas obligatoirement une souris obèse et réciproquement. Finalement, la projection de l'ensemble des individus sur l'ACP nous montre que les individus positivement corrélés avec l'axe 1 correspondent aux individus les plus répondeurs au régime hyperlipidique et les individus négativement corrélés avec l'axe 1 correspondent aux individus les moins répondeurs à ce régime (Figure 43).

En nous basant sur les résultats de l'analyse ACP, nous avons sélectionné les souris non répondeuses et répondeuses suivantes :

- **NR** : H2 H8 H11 H15 H16 H21 H23 H31 H40 H46 (10)
- **R** : H10 H27 H33 H35 H36 H37 H41 H42 H50 (9)

Afin de visualiser plus précisément les liens de similarités entre les différentes souris selon leurs coordonnées sur l'ACP, nous avons réalisé une classification ascendante hiérarchique (CAH) sur composantes principales des souris du groupe high fat (Figure 44). La classification ascendante hiérarchique est une méthode de classification itérative permettant de rassembler les individus ayant un comportement similaire sur un ensemble de variables. Cette méthode possède l'avantage de proposer une représentation graphique permettant de facilement visualiser les individus les plus proches entre eux, les groupes d'individus qui en découlent ainsi que les distances entre les groupes. Ainsi, les individus les plus semblables et les individus les plus dissemblables peuvent être facilement repérés. En conséquence, nous pouvons visualiser l'ensemble des individus les plus sensibles au régime hyperlipidique et les plus proches entre eux (nommés individus répondeurs ou R) et l'ensemble des individus les moins sensibles à ce régime et les plus proches entre eux (nommés individus non répondeurs ou NR). On constate ainsi que les souris contrôles et non-répondeuses sont regroupés au sein de la même classe tandis que les souris répondeuses se situent dans la seconde classe, qui contient également les souris intermédiaires.

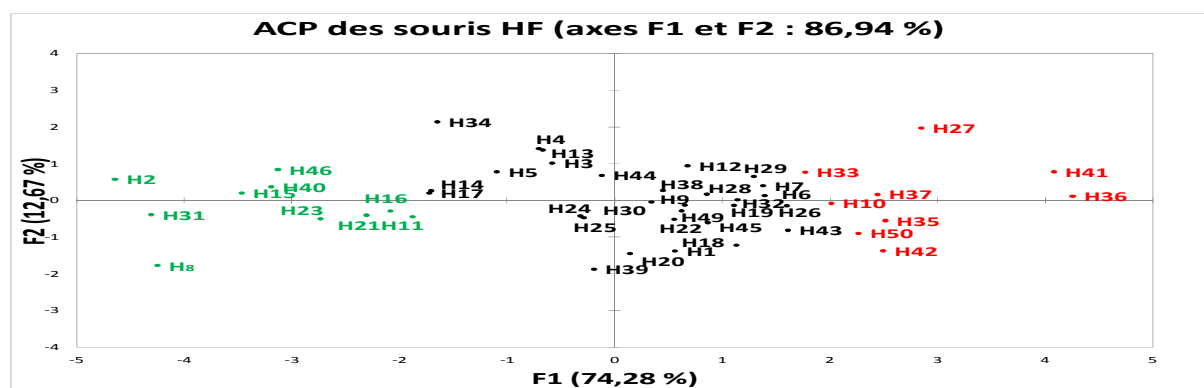


Figure 42 : Représentation des souris high fat sur les deux premiers axes propres de l'ACP. L'ensemble des souris soumises au régime hyperlipidique se répartissent principalement le long de l'axe 1 de l'ACP. En vert : les individus non-répondeurs ; en rouge : les individus répondeurs ; en noir : les individus à l'obésité modérée.

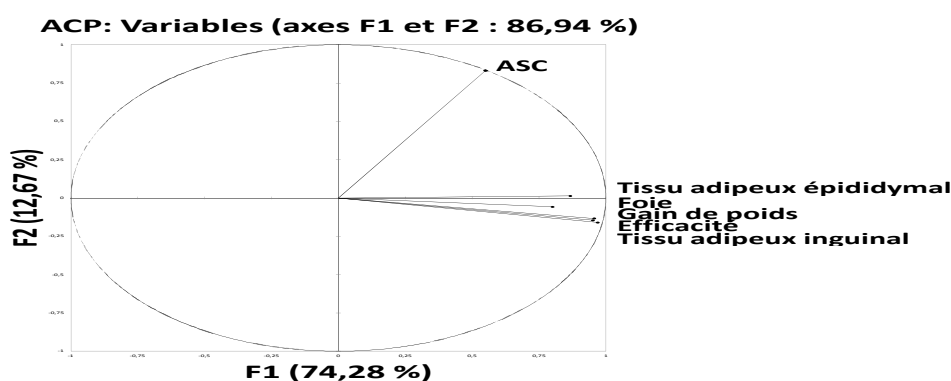


Figure 43 : ACP : Représentation des variables sur les deux premiers axes propres de l'ACP. Le poids des tissus adipeux, le gain de poids, le poids du foie et l'efficacité alimentaire contribuent majoritairement à la formation de l'axe 1 (TE=16,88% ; TI=20,55% ; GP=21,1% ; Foie=14,38% ; EA=20,32%). L'intolérance au glucose contribue à la formation de l'axe 2 (ASC=91%).

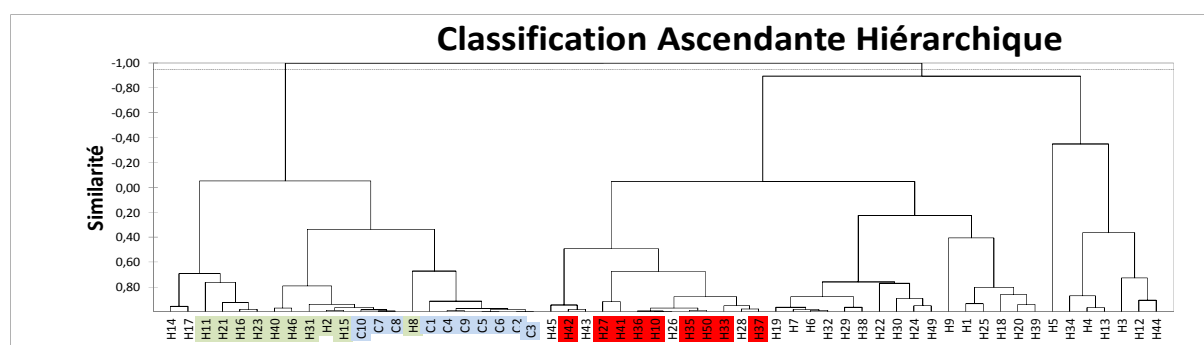


Figure 44 : Dendrogramme issu de la classification ascendante hiérarchique sur composantes principales des souris high fat. Les souris contrôles (en bleu) et non répondeuses (en vert) sont regroupées au sein de la même première classe tandis que les souris répondeuses (en rouge) appartiennent à la seconde classe. La grande majorité des souris « intermédiaires (ni NR ni R) sont regroupées entre elles au sein de la seconde classe.

2. Comparaison des souris contrôles (CONT), répondeuses (R) et non répondeuses (NR)

2.1. Gain de poids et consommation, efficacité alimentaire et poids des organes

Les souris répondeuses prennent beaucoup plus de poids que les souris non répondeuses et que les souris contrôles ($\text{CONT}=5,65 \pm 0,62$; $\text{NR}=13,53 \pm 2,49$; $\text{R}=25,70 \pm 1,91$) (Figure 45). De plus elles ont une consommation alimentaire ($\text{CONT}=321,20 \pm 10,94$; $\text{NR}=210,40 \pm 8,18$; $\text{R}=231,80 \pm 7,38$) et une efficacité alimentaire ($\text{CONT}=1,76 \pm 0,16$; $5,91 \pm 1,01$; $9,84 \pm 0,74$) plus grande que les souris non répondeuses (Figure 45). Le poids du foie ($\text{CONT}=0,99 \pm 0,08$; $\text{NR}=0,94 \pm 0,04$; $1,36 \pm 0,16$), du tissu adipeux épидidymal ($\text{CONT}=0,38 \pm 0,09$; $\text{NR}=1,58 \pm 0,31$, $\text{R}=3,27 \pm 0,37$) et du tissu adipeux inguinal ($\text{CONT}=0,11 \pm 0,02$; $\text{NR}=1,51 \pm 0,42$; $\text{R}=3,62 \pm 0,29$) sont plus élevés chez les souris répondeuses que chez les souris non répondeuses (Figure 45). Les souris répondeuses développent donc une masse grasse et un gain de poids plus conséquent que les souris non répondeuses, signe d'une obésité plus marquée. La consommation alimentaire totale plus élevée chez les souris répondeuses ne permet cependant pas d'expliquer la différence de gain de poids observée avec les souris non répondeuses. L'efficacité alimentaire correspond au gain de poids divisé par la consommation alimentaire, c'est une mesure indirecte de l'efficacité d'extraction énergétique. Les souris répondeuses, bien que consommant plus d'aliment sur l'ensemble du régime ont une capacité d'extraction de l'énergie plus élevée. Par ailleurs, les souris répondeuses ont une glycémie à jeun plus élevée que les souris non répondeuses ($\text{NR}=160,90 \pm 27,30$; $\text{R}=204,11 \pm 16,04$) tandis que les souris non répondeuses et les souris contrôles ont une identique ($\text{CONT}=164,65 \pm 15,40$; $\text{NR}=160,90 \pm 27,30$)

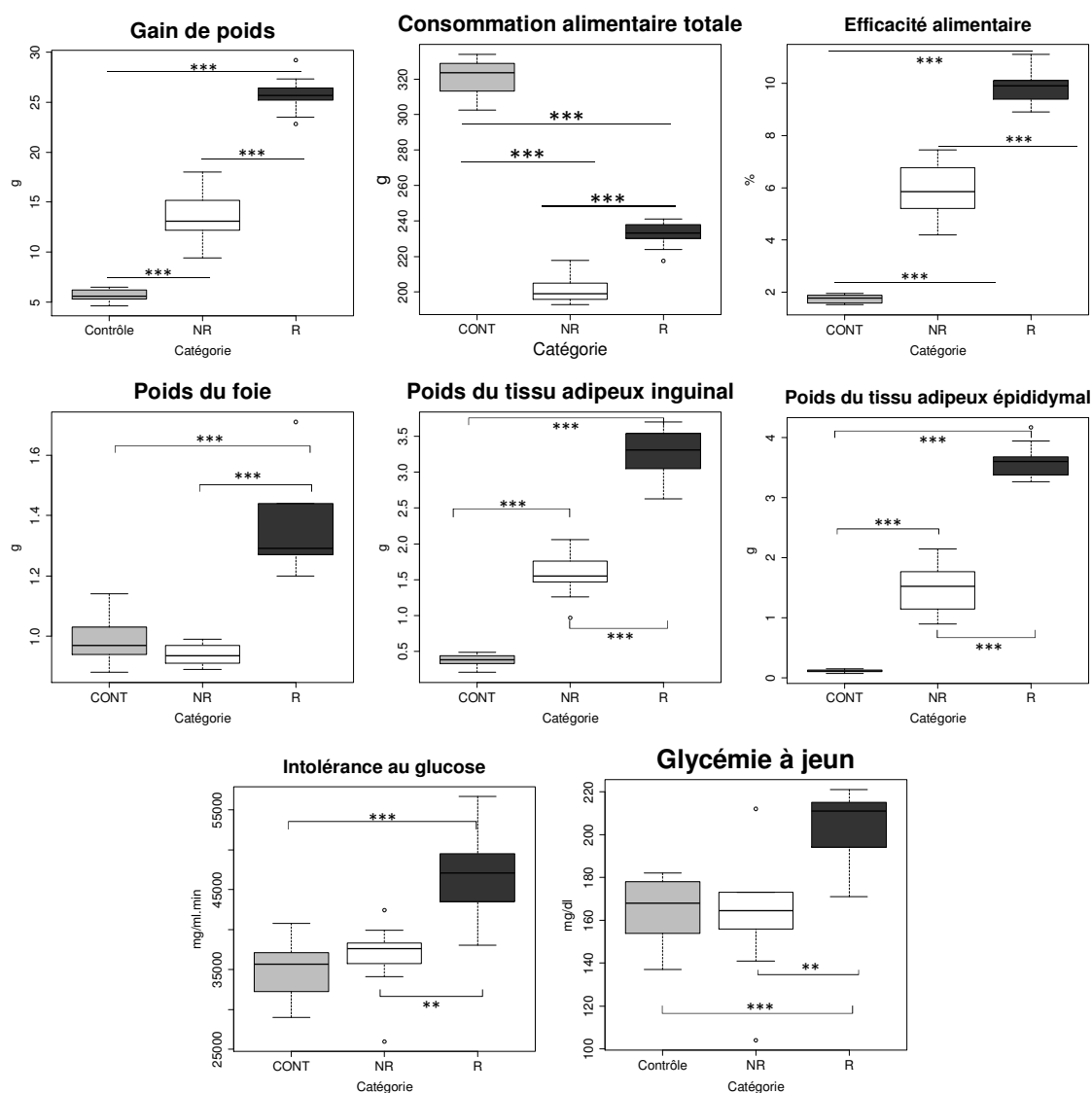


Figure 45 : Comparaison du gain de poids, de la consommation et de l'efficacité alimentaire, du poids des organes, de la glycémie à jeun et de l'intolérance au glucose des souris contrôles, répondeuses et non répondeuses. *** : $p\text{value} \leq 0,001$, ** : $p\text{value} \leq 0,01$.

2.2. Histologie

2.2.1. Coupes histologiques du tissu adipeux inguinal

La comparaison des coupes histologiques du tissu adipeux inguinal des souris contrôles, répondeuses et non répondeuses, permet d'observer un accroissement de la taille des adipocytes chez les souris high fat en comparaison des souris contrôles (Figure 46). De plus, les souris répondeuses semblent avoir des adipocytes plus gros que les souris non répondeuses. A titre d'exemple, 1 souris de chaque groupe est montrée dans la Figure 46. Le régime hyperlipidique entraîne donc un développement de la masse adipeuse et un changement dans le volume des adipocytes. De plus, le tissu adipeux étant le lieu de stockage privilégié des lipides, il semblerait que, sur la base de cette observation, les souris répondeuses emmagasinent plus de lipides dans leur tissu adipeux que les souris non répondeuses.

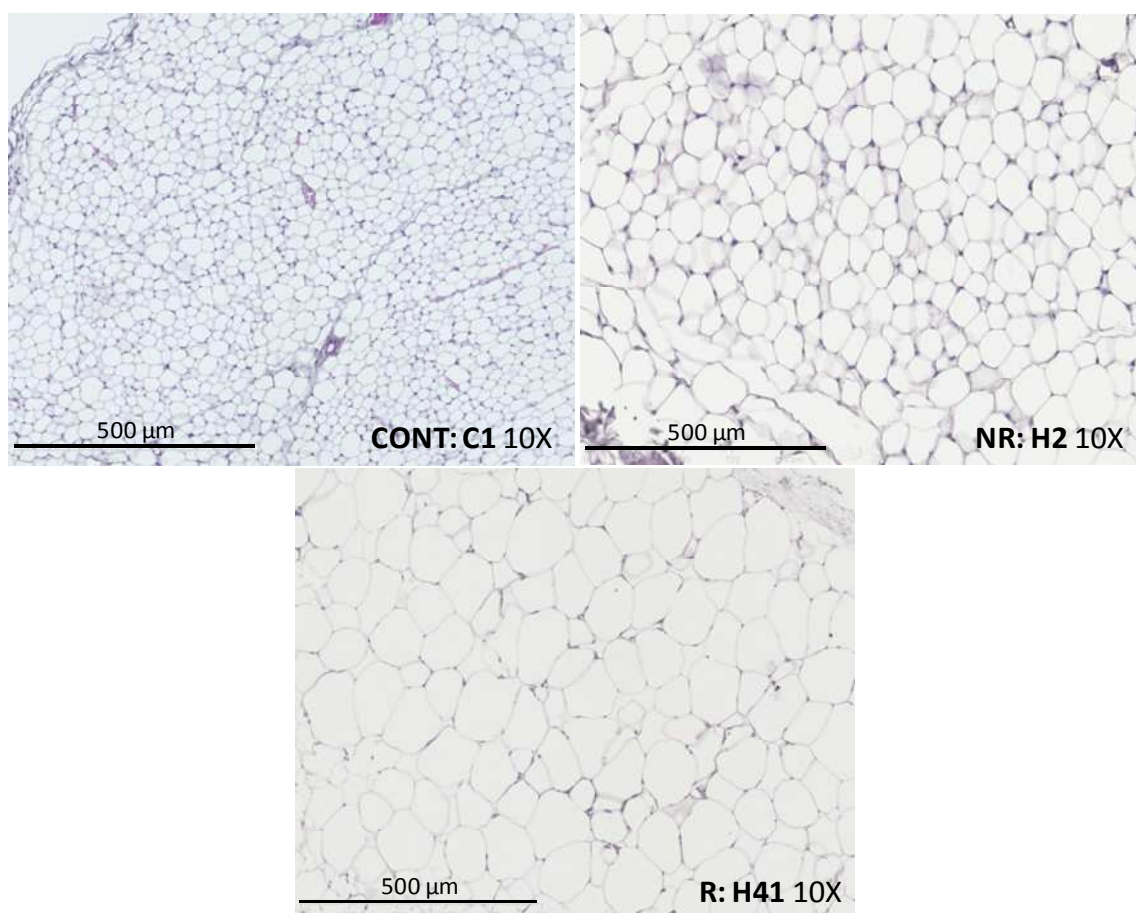


Figure 46 : Coupes histologiques du tissu inguinal. Sont représentées les coupes de tissu adipeux inguinal d'une souris contrôle, répondeuse et non répondeuse. Les adipocytes sont plus gros chez les souris HF comparativement aux souris contrôles. Les souris répondeuses ont également de plus gros adipocytes que les souris non répondeuses. Grossissement 20x. CONT : souris contrôle ; NR : souris non répondeuse ; R : souris répondeuse.

2.2.2. Coupes histologiques du foie

La comparaison histologique des foies des souris contrôles, répondeuses et non répondeuses permet d'observer des différences dans les inclusions lipidiques du tissu (Figure 47). Les souris contrôles ne présentent aucun signe de présence de lipides tandis que le foie des souris non répondeuses montre quelques rares gouttelettes lipidiques. Les foies des souris répondeuses montrent de nombreuses inclusions de gouttelettes de lipides indiquant le développement d'une stéatose plus importante. Le foie des souris répondeuses semble donc absorber et stocker plus de lipides issus du régime hyperlipidique que le foie des souris non répondeuses. A titre d'exemple, une souris de chaque groupe est montrée dans la Figure 47.

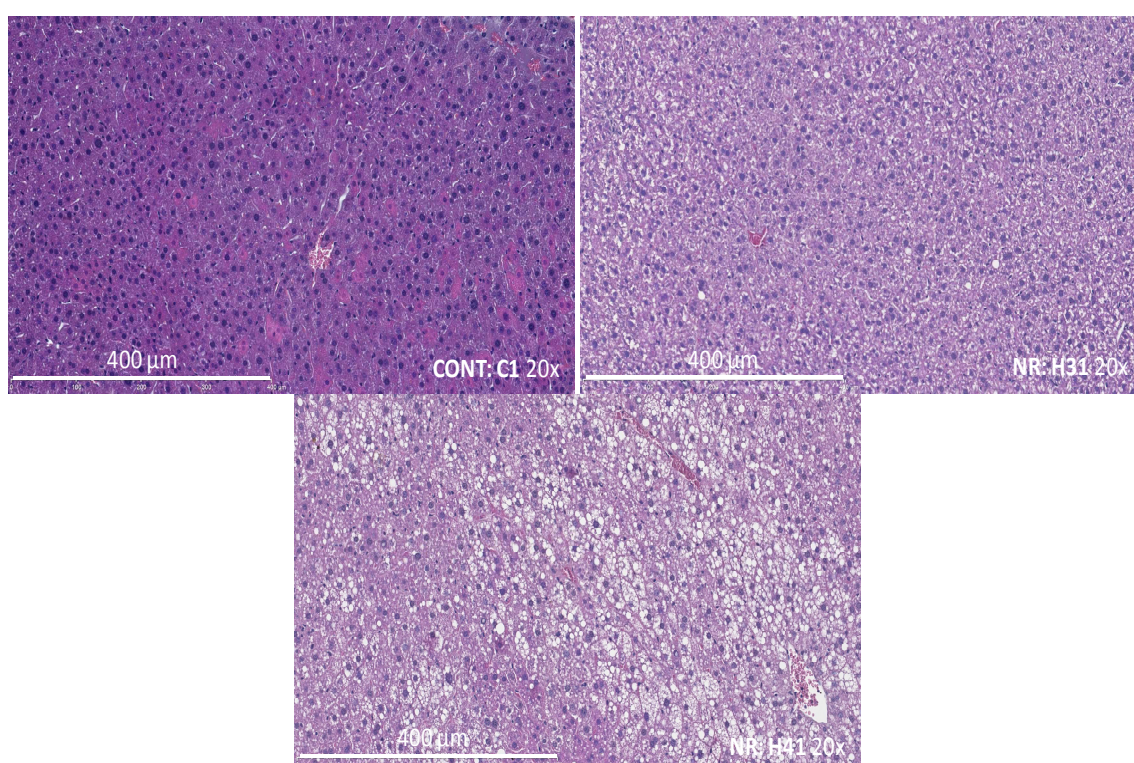


Figure 47 : Coupe histologique du foie. Sont représentées les coupes du foie d'une souris contrôle non répondeuse et répondeuse. Les flèches montrent les inclusions lipidiques. Grossissement 20x. CONT : souris contrôle ; NR : souris non répondeuse ; R : souris répondeuse.

2.2.3 Coupes histologiques de l'iléon

Les coupes histologiques de l'iléon des souris contrôles, répondeuses et non répondeuses (Figure 48) révèlent la présence de vésicules lipidiques dans l'iléon des souris high fat, tandis que

l'iléon des souris contrôles en contient très peu. Le régime hyperlipidique semble donc favoriser une plus forte activité de transport des lipides dans l'iléon des souris high fat. A titre

d'exemple, une souris de chaque groupe est montrée dans la Figure 48. De plus, le régime hyperlipidique impact la structure de l'iléon de façon différente entre les souris non répondeuses et répondeuses. Les villosités des l'épithélium intestinal sont plus grosses et moins bien organisées chez les souris répondeuses. La lumière intestinale des souris répondeuses est plus petite que celle des souris non répondeuses. Enfin la sous-muqueuse des souris répondeuses est plus fine que celle des souris non répondeuses.

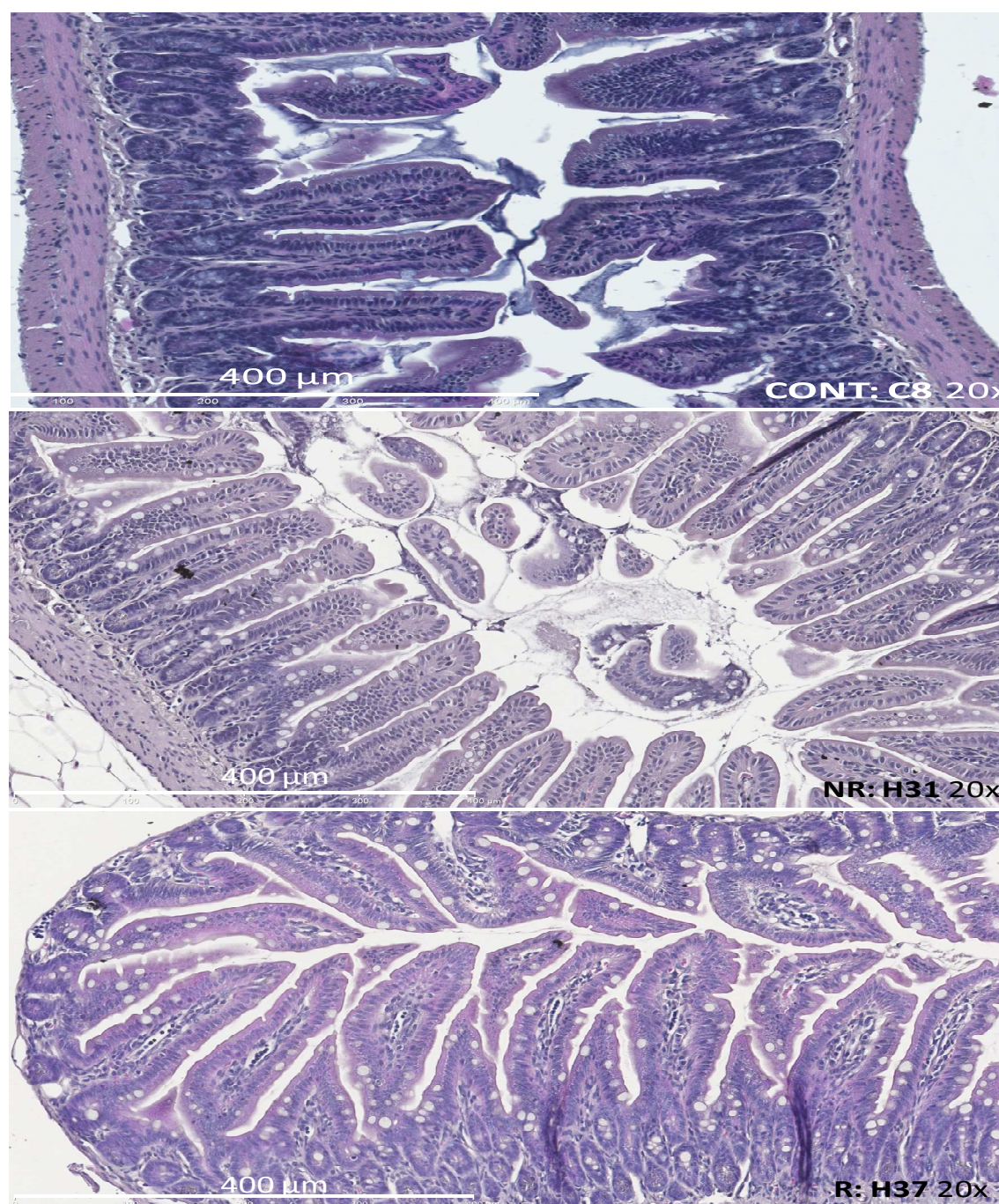


Figure 48 : Coupes histologiques de l'iléon. Sont représentées les coupes de l'iléon d'une souris contrôle, non répondeuse et répondeuse. Les flèches montrent les vésicules lipidiques. Grossissement 20x. CONT : souris contrôle ; NR : souris non répondeuse ; R : souris répondeuse.

2.3. Dosages plasmatiques des cytokines et hormones

Le dosage des hormones peptidiques révèle que les souris répondeuses ont une concentration plasmatique d'insuline et de résistine plus élevée que les souris non répondeuses et que les souris contrôles (Insuline : CONT : 2238 ± 1119 pg/ml ; NR : 3711 ± 1489 pg/ml ; R : 6576 ± 1109 pg/ml. Résistine : CONT : 125273 ± 59774 ; NR : 235260 ± 36774 pg/ml ; R : 394183 ± 81591 pg/ml). On observe par ailleurs que les souris non répondeuses ont une plus forte concentration de résistine que les souris contrôles. (Figure 49). L'insuline est une hormone hypoglycémiant tandis que la résistine, de part sa fixation sur les récepteurs insulino-sensibles, est capable de contrebalancer les effets de l'insuline sur le transport du glucose. Une augmentation combinée de sécrétion d'insuline et de résistine peut-être un facteur contribuant à la mise en place d'un état d'insulinorésistance chez les souris répondeuses.

Le calcul de l'indice HOMA-IR (Homeostatic Model Assessment – Insulin Resistance) permet d'évaluer l'état d'insulinorésistance des 3 groupes de souris. Le calcul de cet indice est fondé sur le dosage simultané de l'insulinémie et de la glycémie à jeun, permettant une approche simple pour estimer l'insulinosécrétion et l'insulinosensibilité (Matthews DR, Hosker J Diabetologia 1985). Nous constatons ainsi que l'indice HOMA-IR des souris répondeuses est 2,25 fois plus élevé que celui des souris non répondeuses, ce qui indique que le niveau d'insulinorésistance est plus élevé chez les souris répondeuses. De plus, l'indice HOMA-IR des souris répondeuses est 4,10 fois plus élevé que celui des souris contrôles et celui des souris non répondeuses est 1,80 fois plus élevé que celui des souris contrôles. (CONT = $19,88 \pm 13,85$; NR = $36,25 \pm 16,44$; R = $81,71 \pm 20,67$) (Figure 49 : Insulinorésistance).

La leptine est en concentration plus élevée dans le plasma des souris répondeuses que dans le plasma des souris non répondeuses et des souris contrôles. Par ailleurs, les souris non répondeuses ont une plus grande concentration plasmatique de cette hormone que les souris contrôles (CONT : 1149 ± 447 pg/ml ; NR : 14450 ± 8899 pg/ml ; R : 66959 ± 19866) (Figure 49). La leptine est une hormone anorexigène qui agit notamment au niveau de l'hypothalamus. Le fait que les souris répondeuses sécrètent davantage de leptine est à mettre en parallèle de leur masse grasse plus importante que celle des souris non répondeuses. Par ailleurs, ceci pourrait également indiquer une dérégulation dans le contrôle de l'appétit chez ces souris (Figure 49).

Le dosage des cytokines au niveau du plasma révèle qu'il n'existe pas de différence de concentration d'IL10, de TNF α et d'IFN γ entre les trois groupes (non montré). Cependant, les souris répondeuses ont une plus forte concentration plasmatique de MCP1 que les souris non répondeuses (NR : $68,88 \pm 14,04$ pg/ml ; R : $100,18 \pm 22,74$ pg/ml) et que les souris contrôles (CONT : $58,12 \pm 11,20$ pg/ml ; R : $100,18 \pm 22,74$ pg/ml) (Figure 49). Les souris non répondeuses ont une plus forte concentration d'IL17A que les souris contrôles (NR : $11,06 \pm 5,70$; CONT : $4,22 \pm 2,25$; R : $9,22 \pm 7,14$) (Figure 49). Enfin, les souris non répondeuses et les souris répondeuses ont une plus forte concentration plasmatique d'IL6 que les souris contrôles (CONT : $0,07 \pm 0,12$ pg/ml ; NR : $2,31 \pm 3,89$; R : $1,95 \pm 1,85$) (Figure 49). MCP1 est une cytokine marqueur de l'inflammation responsable notamment du recrutement des macrophages au niveau du tissu adipeux. Les souris répondeuses pourraient avoir un niveau d'inflammation du tissu adipeux (non mesuré) plus élevé que les souris non répondeuse et le régime hyperlipidique

pourrait être à l'origine d'une inflammation systémique de l'ensemble des souris high fat (concentration plus élevées de MCP1 et d'IL6 par rapport aux contrôles).

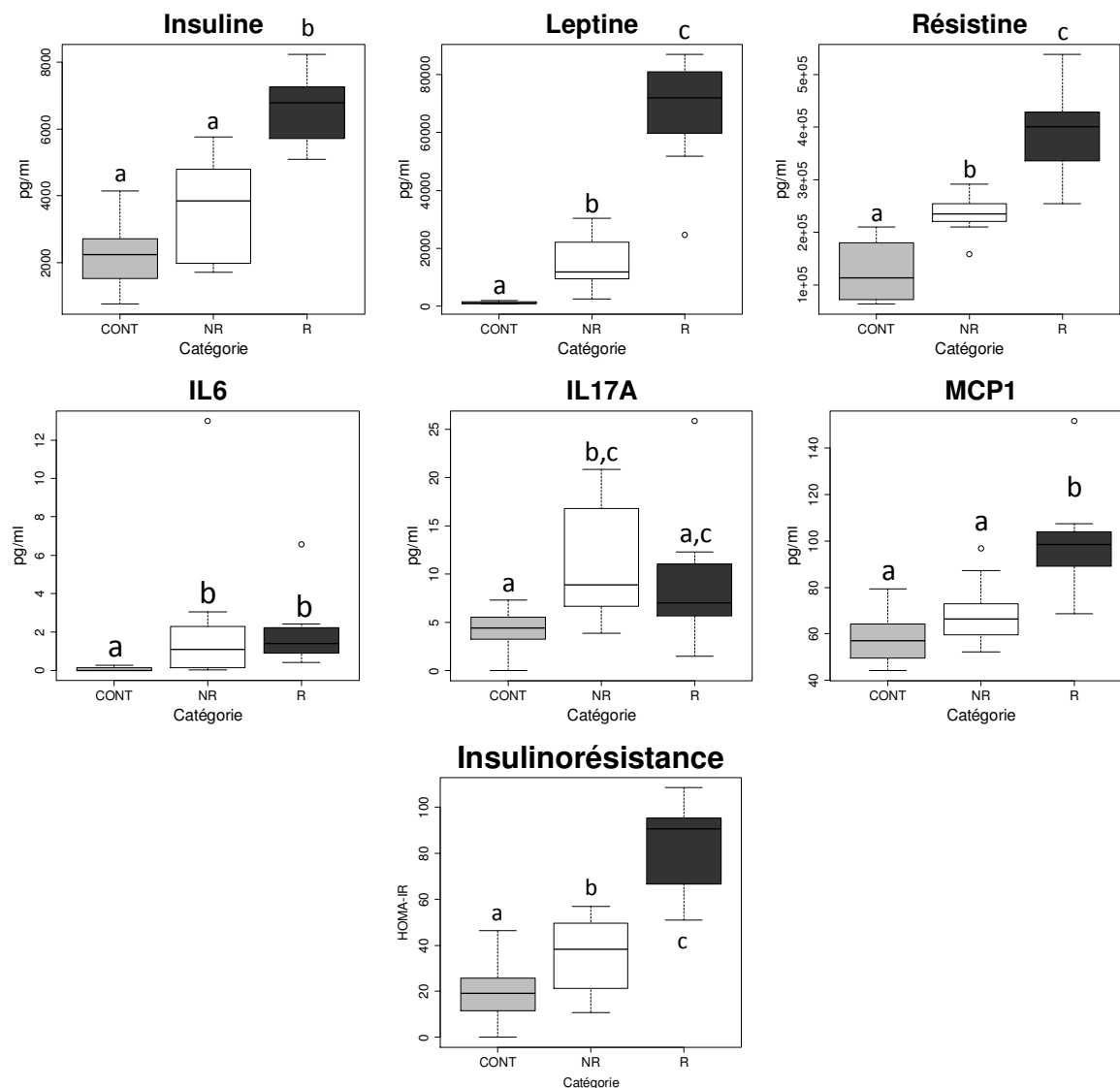


Figure 49 : Dosages plasmatiques de 3 hormones et de 3 cytokines par la technologie Luminex et évaluation de l'insulinorésistance des souris par calcul de l'indice HOMA-IR. Insuline : $p_{\text{CONT}/\text{R}}=0,0008551$; $p_{\text{NR}/\text{R}}=0,001091$; Leptine : $p_{\text{CONT}/\text{NR}}=0,0003793$ $p_{\text{CONT}/\text{R}}=0,000532$ $p_{\text{NR}/\text{R}}=0,0004465$; Résistine : $p_{\text{CONT}/\text{NR}}=0,001381$ $p_{\text{CONT}/\text{R}}=0,000532$ $p_{\text{NR}/\text{R}}=0,0004465$; IL6 : $p_{\text{CONT}/\text{NR}}=0,0009226$ $p_{\text{CONT}/\text{R}}=0,0004451$ $p_{\text{NR}/\text{R}}=0,5127$; IL17A : $p_{\text{CONT}/\text{NR}}=0,005083$; MCP1 : $p_{\text{CONT}/\text{R}}=0,0007462$ $p_{\text{NR}/\text{R}}=0,002497$; Insulinorésistance : $p_{\text{CONT}/\text{NR}}=0,04099$ $p_{\text{CONT}/\text{R}}=0,000532$ $p_{\text{NR}/\text{R}}=0,000815$.

2.4. Expression des gènes

2.4.1. Foie

Les analyses d'expression de gènes faites sur les souris CONT se sont révélées inexploitable du fait de la disparité des quantités relatives et du peu d'échantillons analysés (3 échantillons). Les analyses d'expressions ont donc porté sur les groupes NR et R.

Nous avons réalisé une ACP des souris répondeuses et non répondeuses en prenant comme variable l'ensemble des gènes analysés. Les deux premiers axes de l'ACP cumulent 78,05% de la variabilité totale et nous constatons que les deux groupes de souris NR et R se distinguent de part et d'autre de l'axe 2 (Figure 50). L'ensemble des gènes analysés pourrait donc servir de marqueurs hépatiques potentiels du statut de répondeur ou non répondeur.

Nous avons analysés l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse (ACC, FAS, SREBP, CHREBP, PPAR γ), le catabolisme lipidique (cétogenèse) (PPAR α), l'absorption lipidique (CD36), et l'inflammation (IL6, IL1B, TNFa) chez les souris répondeuses et non répondeuses (Figure 51). L'expression des gènes impliqués dans l'inflammation est similaire entre les souris NR et les souris R. Le phénotype répondeur ne semble donc pas associé à une augmentation de l'inflammation hépatique. D'autre part, l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme et le catabolisme des lipides (ACC, FAS, SREBP, CHREBP, PPAR γ , et PPAR α) n'est pas différente entre les souris répondeuses et non répondeuses. La régulation de la balance oxydation/synthèse des lipides ne semble donc pas être affectée de manière distincte dans le foie.

L'expression de FAS et de CD36 est plus élevée dans le groupe R que dans le groupe NR, tandis que l'on n'observe aucune différence significative dans l'expression d'ACC. Le niveau d'expression de CD36 pourrait indiquer une plus forte activité de transport des lipides dans le foie des souris R afin de stocker les lipides en excès absorbés pendant le régime. La plus forte expression de FAS semble indiquer une plus forte activité de biosynthèse des lipides chez les souris R. La régulation insulino-dépendante de FAS pourrait conduire, selon l'état d'insulinorésistance de l'individu, à une dérégulation de l'équilibre oxydation/lipogenèse chez des individus ayant des apports caloriques excessifs (H.S. Sul, M.J. Latasa J Nutr 2000).

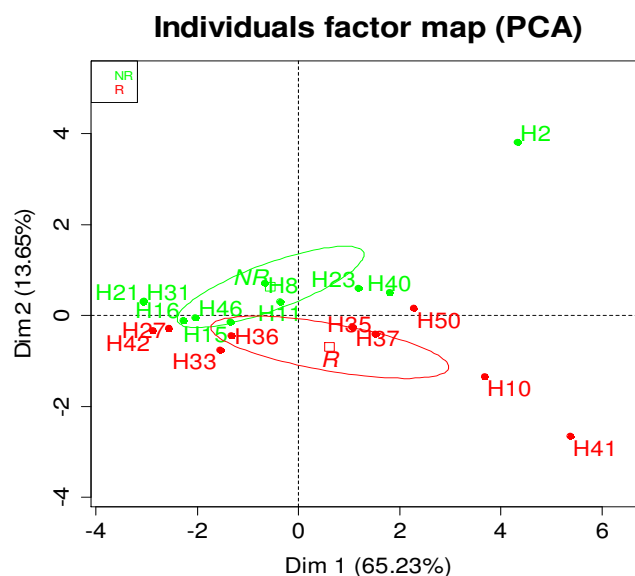


Figure 50 : Analyse en composantes principales de l'expression des gènes hépatiques des souris NR et R. a. Projection de l'ensemble des individus sur l'ACP : les souris NR et R sont réparties de chaque côté de la composante 2. Le groupe NR (en vert) est positivement corrélé et le groupe R (en rouge) est négativement corrélé à la composante 2.

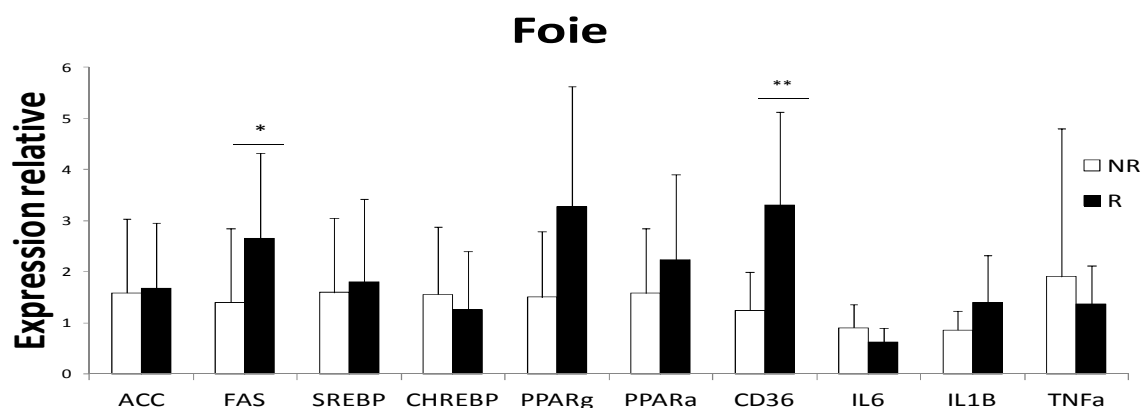


Figure 51 : Quantité relative de l'expression des gènes hépatiques. Les résultats sont normalisés par rapport au groupe non répondeur (NR). n=10 pour les NR et n=9 pour les R. ACC, Acetyl CoA Carboxylase ; FAS, Fatty acid synthase ; SREBP, Sterol response element binding protein ; CHREBP, Carbohydrate response element binding protein ; PPAR γ , Peroxisome proliferator-activated protein gamma ; PPAR α , Peroxisome proliferator-activated protein alpha ; CD36, Cluster de différenciation 36 ; IL6 Interleukine 6 ; Interleukine 1B ; TNF α , Tumor necrosis factor alpha. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$.

2.4.2. Iléon

Les analyses d'expression de gènes de l'iléon ont été réalisées sur les 3 groupes : contrôle, répondeur et non répondeur.

Nous avons réalisé une ACP sur l'ensemble des gènes analysés des souris répondeuses et non répondeuses (Figure 52). Les deux premiers axes de l'ACP cumulent près de 62% de la variabilité totale. Cependant, nous ne pouvons pas distinguer les deux groupes NR et R sur cette analyse et l'ensemble des gènes analysés ici ne permet pas de différencier l'appartenance d'une souris à un groupe (répondeur ou non répondeur).

D'autre part, sur les bases de la Figure 53, nous constatons qu'il n'y pas d'effet du régime hyperlipidique dans l'iléon puisque la majorité des gènes analysés ne montrent pas de différence d'expression entre les souris CONT, R et NR. De plus, pour la majorité des gènes analysés il n'existe pas de différence d'expression entre NR et R ce qui implique que la distinction des souris répondeuses et non répondeuses ne peut pas se faire sur la base de l'expression de ces gènes.

Néanmoins, l'analyse de l'expression des gènes dans l'iléon révèle que les souris répondeuses ont une plus forte expression du gène codant le gène de la Fatty Acid Binding Protein 2 (FABP2) que les souris non répondeuses et contrôles (CONT=1,1 \pm 0,47 ; NR=2,35 \pm 0,97 ; R=3,98 \pm 1,76, normalisation faite par rapport aux contrôles) (Figure 53). FABP2 est une petite protéine soluble et abondante dans le cytoplasme des cellules de l'intestin. Sa fonction biologique exacte reste assez méconnue bien que l'on sache qu'elle soit notamment impliquée dans l'assimilation, le transport et le métabolisme des acides gras (Luis B. Agellon Drozdowski L. Biophysica Acta 2007).

Les souris non répondeuses ont une plus forte expression du gène codant la G-Protein-Coupled-Receptor 41 (GPR41) que les souris contrôles (CONT=1,05 \pm 0,29 ; NR=1,51 \pm 0,38 ; R=1,31 \pm 0,45). Gpr41 (aussi appelée Free FattyAcid Receptor 3 ou Ffar3) est un récepteur membranaire couplé à une protéine G exprimé à la surface des cellules entéroendocrines bien qu'on le retrouve également dans le tissu adipeux (Daisuke Inoue Front Endocrinol 2014). Gpr41 est un régulateur de la balance énergétique de l'hôte. En se liant à Gpr41, les AGCC stimulent la sécrétion du Peptide YY (PYY) par les cellules entéroendocrines. PYY est un peptide satiétogène (Ueno, Hiroaki Regulatory Peptides 2008). Il est cependant difficile de conclure sur cette différence de niveau d'expression de GPR41 d'autant que les souris répondeuses et non répondeuses ont un niveau d'expression de PYY comparable.

Les souris non répondeuses ont une plus faible expression du gène codant la protéine Glucose transporter 2 (GLUT2) que les individus contrôles (CONT=1,18 \pm 0,71 ; NR=0,62 \pm 0,40 ; R=0,94 \pm 0,95). GLUT2 est une protéine transmembranaire implantée sur la face apicale et la partie basolatérale des entérocytes et permettant la diffusion facilitée des sucres dans la circulation sanguine (Pia V. Röder PLoSOne 2014). Ce résultat pourrait indiquer que le phénotype non répondeur pourrait être en partie dû à une moindre absorption du glucose.

Les souris répondeuses ont une plus faible expression de Claudine-2 (CLDN2) que les souris contrôles (CONT=1,012 \pm 0,17 ; NR=0,86 \pm 0,37 ; R=0,68 \pm 0,28). Les claudines sont

une famille de protéines transmembranaires et sont les principales composantes (avec les occludines) de la mise en place et du maintien des jonctions serrées des tissus épithéliaux. Ces jonctions serrées assurent l'étanchéité entre deux compartiments tissulaires et la CLDN2 est retrouvée exclusivement au niveau des cryptes de l'iléon et du côlon (Dorothee Günzel Physiol Comprehensive Physiology 2012). Ce résultat semble indiquer que le régime hyperlipidique pourrait entraîner une plus grande perméabilité intestinale uniquement chez les souris répondeuses. Cette perméabilité intestinale pourrait expliquer, selon l'hypothèse développée par P. Cani, le développement de l'obésité et des désordres métaboliques associés (hyperglycémie, stéatose...) observés chez les souris répondeuses.

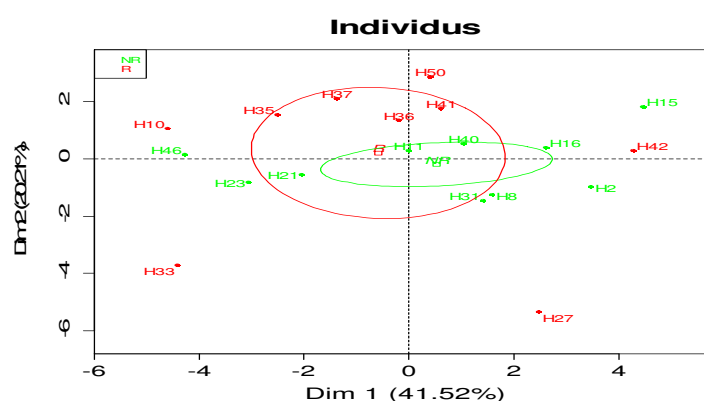


Figure 52 : Analyses en composantes principale de l'expression des gènes de l'iléon des souris NR et R. Les deux groupes ne se séparent pas sur l'ACP.

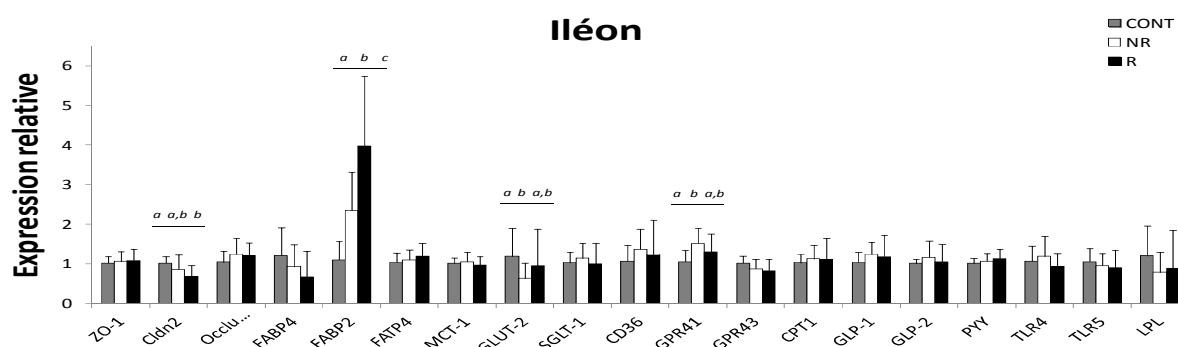


Figure 53 : Quantité relative de l'expression de gènes dans l'iléon impliqués dans la perméabilité intestinale, le transport de lipides et de glucose, les récepteurs de lipides, le métabolisme oxydatif des lipides, l'absorption du glucose, la sensation de satiété et l'inflammation. Les résultats sont normalisés par rapport au groupe non contrôle (CONT). n=10 pour les CONT, n=10 pour les NR et n=9 pour les R. Cldn2: $p_{C/NR}=0,01$, GLUT-2: $p_{C/NR}=0,03$; GPR41: $p_{C/NR}=0,01$; FABP2: $p_{C/NR}=0,003$ $p_{C/R}=0,04$ $p_{NR/R}=0,025$. ZO-1, Zonula occludens; Cldn2, Claudin 2; FABP4, Fatty acid binding protein 4; FABP2, Fatty acid binding protein 2; FATP4, Fatty acid transporter 4; MCT-1, Monocarboxylate transporter 1; GLUT-2, Glucose transporter 2; SGLT-1, Sodium-glucose transporter 1; CD36, Cluster of differentiation 36; GPR41, G-protein coupled receptor 41; GPR43, G-coupled protein receptor 43; CPT-1, Carnityl plamitoyltransferase; GLP-1, Glucagon like protein 1; GLP-2, Glucagon like protein 2; PYY, Peptide YY; TLR4, Toll like receptor 4; TLR5, Toll like receptor 5; LPL, lipoprotein lipase.

2.4.3. Tissu adipeux inguinal

Les analyses d'expression de gènes du tissu adipeux inguinal ont été réalisées sur les 3 groupes : contrôle, répondeur et non répondeur.

Nous avons réalisé une ACP sur l'ensemble des gènes analysés des souris répondeuses et non répondeuses (Figure 54). Les deux premiers axes de l'ACP cumulent près de 75% de la variabilité totale. Cependant, nous ne pouvons pas distinguer les deux groupes NR et R sur cette analyse et l'ensemble des gènes analysés ici ne permet pas de différencier l'appartenance d'une souris à un groupe (répondeur ou non répondeur).

Nous constatons également qu'il y a peu d'effet du régime hyperlipidique sur l'expression des gènes au niveau de l'iléon puisque la majorité des gènes analysés ne montrent pas de différence d'expression entre les souris CONT, R et NR. De plus, pour la majorité des gènes analysés il n'existe pas de différence d'expression entre NR et R ce qui implique que l'expression des gènes analysés ici ne permet pas de distinguer les souris répondeuses des souris non répondeuses (Figure 55).

De plus, sur l'ensemble des gènes analysés dans ce tissu seul le gène codant la Fatty Acid Synthase (FAS) montre une différence d'expression entre répondeur et non répondeur ($NR=7,09 \pm 7,05$; $R=30,98 \pm 15,99$). Les individus répondeurs ont une plus forte expression du gène codant la FAS, comparés aux individus non répondeurs et aux individus contrôles. Les individus non répondeurs ont une expression de FAS plus forte que les individus contrôles ($CONT=1,24 \pm 0,90$; $NR=7,09 \pm 7,05$; $R=30,98 \pm 15,99$) (Figure 55). Le tissu adipeux est le principal site de stockage de l'énergie au sein duquel se forment les triglycérides en période postprandiale (lipogenèse) et libère cette énergie stockée sous forme de glycérol et d'acides gras libres en période de jeûne (lipolyse). En réalisant la biosynthèse des acides gras linéaires saturés, FAS est donc un acteur essentiel dans le métabolisme énergétique de l'individu (Hillgartner FB, Salati LM, *Physiol Rev* 1995 ; Semenkovich CF *Prog Lipid Res* 1997). L'importance de la lipogenèse *de novo* varie selon l'apport alimentaire : elle augmente lorsque l'apport calorique dépasse les besoins énergétiques ce qui conduit à un stockage du surplus nutritionnel sous forme de triglycérides. Des concentrations élevées d'insuline circulante ou un état d'insulinorésistance sont une des causes démontrée de cette surexpression de FAS (Javier A. Menendez *Clinical Chemistry* 2009). Les souris répondeuses ont une consommation alimentaire plus forte et un état d'insulinorésistance plus élevé que les souris non répondeuses. Ceci pourrait donc expliquer que les souris répondeuses aient une lipogenèse *de novo* dérégulée dans le tissu adipeux, notamment par une surexpression de FAS.

Dans notre étude, les souris high fat (répondeuses et non répondeuses) ont une plus faible expression des gènes codant l'Acétyl-coenzyme A carboxylase (ACC) ($CONT=1,01 \pm 0,51$; $NR=0,28 \pm 0,26$; $R=0,36 \pm 0,18$) (Figure 55). Par ailleurs, nous n'observons pas de différence entre les groupes répondeurs et non répondeurs. Cette enzyme intervient dans la première étape de la synthèse des acides gras, juste avant la FAS. L'enzyme transfère du bicarbonate pour activer l'Acétyl-coenzyme A cytoplasmique en Malonyl-coenzyme A, intermédiaire métabolique de la synthèse des acides gras. Cette enzyme est l'enzyme clé de la synthèse des acides gras et constitue donc l'étape limitante de cette voie métabolique. La diminution de l'expression d'ACC chez les

souris high fat reflète probablement une plus faible activité de la synthèse *de novo* des lipides ce qui s'explique par le fait que les souris high fat absorbent beaucoup de lipides issus de l'alimentation.

Les souris high fat (répondeuses et non répondeuses) ont une plus faible expression de la Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP1) que les individus contrôles (CONT=0,86 \pm 0,30 ; NR=0,24 \pm 0,16, R=0,38 \pm 0,13) (Figure 55). La MCP1 est une cytokine, marqueur de l'inflammation, pouvant être sécrétée par plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales, les macrophages, les myocytes, et les fibroblastes. Au niveau du tissu adipeux, MCP1 est sécrétée par les adipocytes et va se fixer, notamment, sur le récepteur CCR2 des macrophages stimulant ainsi leur migration vers les adipocytes (Christiansen T, Richelsen B Journal of Obesity 2005). Etonnement, les souris répondeuses et non répondeuses présentent donc un niveau d'inflammation comparable de leurs tissus adipeux respectifs et dans une moindre proportion que les souris du groupe contrôles. Il semble donc que l'infiltration macrophagique du tissu adipeux qui est généralement observé au cours du développement de l'obésité n'a pas eu lieu chez les souris high fat au cours de notre expérimentation. Ceci est confirmé par le faible niveau d'expression d'IL6 et de TNF α .

Les souris high fat (répondeuses et non répondeuses) ont une plus faible expression du PPAR γ que les individus contrôles (CONT=1,11 \pm 0,50 ; NR=0,32 \pm 0,29, R=0,38 \pm 0,24) (Figure 55). Les PPAR sont des protéines de la superfamille des récepteurs nucléaires liant naturellement les lipides et agissant comme facteur de transcription de gènes cibles impliqués dans des processus cellulaires essentiels tels que l'adipogenèse, le métabolisme des lipides, l'inflammation et le maintien de l'homéostasie énergétique (Barish GD Nakar VA J Clin Invest 2006). PPAR γ est principalement exprimé dans le tissu adipeux (M.A Lazar Biochimie 2005) et contrôle également la sécrétion de plusieurs hormones ou protéines tels que l'adiponectine, la résistine, TNF α ou la leptine (Iwaki M Diabetes 2003, Tomaru C Steger DJ J Biol Chem 2009). On constate par ailleurs que l'expression de TNF α (cytokine proinflammatoire) est identique entre les souris répondeuses et non répondeuses et que l'expression de TNF α a tendance à être plus faible chez les souris contrôles. Bien que l'expression de la leptine et de la résistine n'ai pas été analysée, ce résultat semble confirmer que le niveau inflammatoire des souris répondeuses et non répondeuses puisse être comparable. Il est toutefois surprenant que les souris high fat présente une expression plus faible des gènes codant des protéines proinflammatoires telles que MCP1 et TNF α que les souris contrôles. Dans notre étude, l'inflammation du tissu adipeux ne semble pas être corrélée au développement de l'obésité et au statut répondeur/non répondeur.

Les souris répondeuses ont une plus forte expression du gène codant la protéine ANGPTL4 (anciennement nommé FIAF) que les souris contrôles mais identiques aux souris non répondeuses (CONT=1,08 \pm 0,42 ; R=2,96 \pm 1,90) (Figure 55). ANGPTL4 est produit par le tissu adipeux mais aussi par le foie, l'intestin et le muscle. Cette protéine sécrétée est un inhibiteur de la Lipoprotéine Lipase (LPL, enzyme qui hydrolyse les triglycérides contenus dans les VLDL (Very Low Density Lipoproteins) et est une cible des PPAR γ (Dijk W Trends Endocrinol Metab 2014). Le niveau d'expression d'ANGPTL4 des souris répondeuses est donc certainement corrélé à leur capacité de stockage des lipides et au développement de leurs masses grasses.

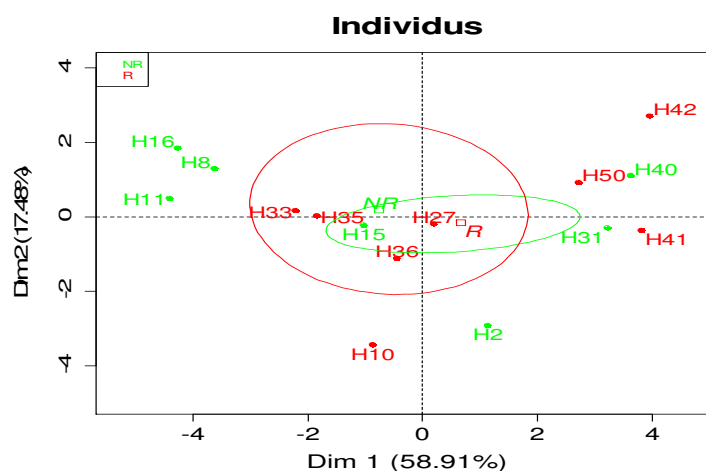


Figure 54 : Analyse en composantes principales de l'expression des gènes du tissu adipeux inguinal des souris NR et R. Les deux groupes ne se séparent pas sur l'ACP.

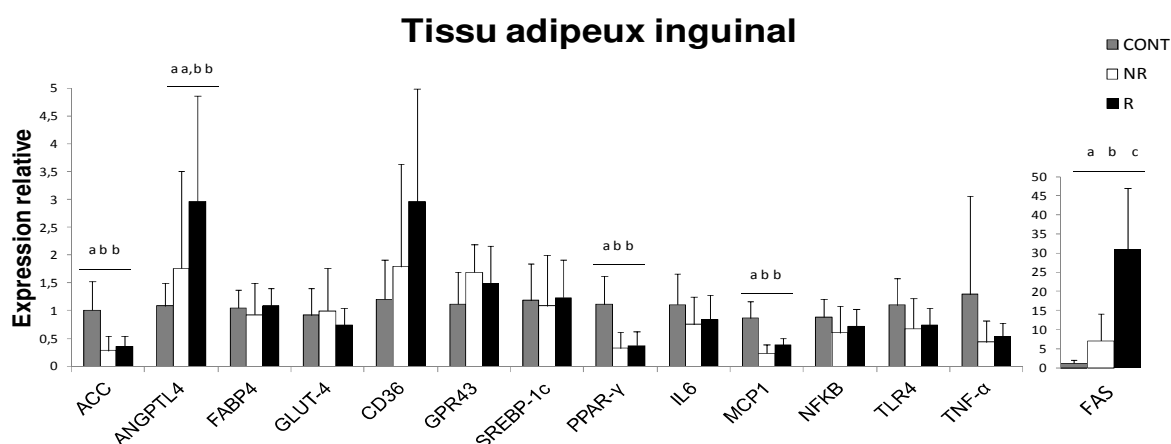


Figure 55 : Quantité relative de l'expression de gènes dans le tissu adipeux inguinal. Les résultats sont normalisés par rapport au groupe contrôle (CONT). n=7 pour les CONT, n=7 pour les NR et n=8 pour les R. ACC : $p_{C/R}=0,017$ $p_{C/NR}=0,015$; ANGPTL4 : $p_{C/R}=0,032$; PPAR- γ : $p_{C/R}=0,009$ $p_{C/NR}=0,01$; MCP1 : $p_{C/R}=0,0031$ $p_{C/NR}=0,0032$; FAS : $p_{C/R}=0,0014$ $p_{C/NR}=0,04$ $p_{NR/R}=0,006$. ACC, Acetyl Coa Carboxylase ; ANGPTL4, Angiopoietin protein like 4 ; FABP4, Fatty acid binding protein ; GLUT-4, Glucose transporter 4 ; CD36, Cluster de différenciation 36 ; GPR43, G-coupled protein receptor 43 ; SREBP-1c, Sterol element binding protein 1 ; PPAR- γ , Peroxisome proliferator activated-receptor gamma ; IL6, Interleukin 6 ; MCP1, Monocyte chemoattractant protein 1 ; NF κ B, Nuclear factor kappa B ; TLR4, Toll like receptor 4 ; TNF- α , Tumor necrosis factors alpha.

2.4.4. Muscle gastrocnémien

Le muscle gastrocnémien des souris contrôles n'a pas été prélevé et les analyses d'expression de gènes n'ont donc pas pu être faites sur ce tissu. En effet, deux expérimentations animales ont été nécessaires afin d'obtenir les prélèvements de l'ensemble des souris (contrôles + high fat). Lors de la première expérimentation qui nous a permis d'obtenir les prélèvements des souris contrôles, nous n'avions alors pas prévu de prélever le muscle gastrocnémien.

Nous avons réalisé une ACP sur l'ensemble des gènes analysés des souris répondeuses et non répondeuses en prenant comme variable l'ensemble des gènes analysés (Figure 56). Les deux premiers axes de l'ACP cumulent un peu plus de 45% de la variabilité totale. Cependant, nous ne pouvons pas distinguer les deux groupes NR et R sur cette analyse et l'ensemble des gènes analysés ici ne permet pas de différencier l'appartenance d'une souris à un groupe (répondeur ou non répondeur).

L'analyse de l'expression de gènes dans le muscle gastrocnémien révèle que, comparés aux individus non répondeurs, les individus répondeurs ont une plus faible expression des gènes codant NDUFA11 (NR=1,01 \pm 0,15 ; R=0,86 \pm 0,068), PDK4 (NR=0,94 \pm 0,13 ; R=0,69 \pm 0,13), PPAR α (NR=0,93 \pm 0,18 ; R=0,67 \pm 0,18) et UCP3 (NR=1,01 \pm 0,15 ; R=0,76 \pm 0,17) (Figure 57).

La protéine NDUFA11 (NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex subunit 11) est une sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire située sur la membrane interne mitochondriale, intervenant dans les processus d'oxydation-réduction et le transfert d'électrons le long de la chaîne respiratoire. C'est une protéine essentielle dans le contrôle de l'homéostasie énergétique de la cellule.

La protéine PDK4 ou Pyruvate Dehydrogenase lipoamide Kinase isoenzyme 4 est une isoenzyme de la Pyruvate Dehydrogenase Kinase. Cette protéine localisée dans la matrice mitochondriale inhibe le Complexe Pyruvate Déshydrogénase (PDC) en phosphorylant une de ses sous-unités, ce qui entraîne une diminution de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA. Le pyruvate est notamment issu de la glycolyse tandis que l'acétyl-CoA peut ensuite entrer dans le cycle de Krebs afin de fournir les intermédiaires énergétiques conduisant à la production d'ATP à travers la chaîne respiratoire mitochondriale. Les souris répondeuses semblent donc plus à même d'utiliser le potentiel énergétique cellulaire que les souris non répondeuses.

PPAR α est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires liant naturellement les lipides. Dans le muscle, ce récepteur joue un rôle essentiel dans le métabolisme des lipides et notamment dans leurs oxydations (Grygiel-Górniak B Nutr J 2014). Les souris répondeuses semblent donc avoir une moins bonne capacité oxydative que les souris non répondeuses.

UCP3 ou Uncoupled Protein 3 est un transporteur mitochondrial qui permet le découplage des transports de protons à travers la membrane interne mitochondriale lors de la respiration cellulaire. Cette protéine facilite le transfert d'anions de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire et le retour d'un proton H⁺ dans la matrice mitochondriale. Ces échanges moléculaires entraînent une dissipation d'énergie sous forme de chaleur au niveau mitochondrial

et affecte donc l'efficacité du métabolisme énergétique de l'individu. Les souris répondeuses pourraient donc avoir une plus faible dissipation thermique cellulaire que les souris non répondeuses.

L'ensemble de ces résultats d'expression de gènes laissent à penser que les souris non répondeuses pourraient avoir une meilleure capacité d'oxydation des lipides ainsi qu'une plus forte activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et une meilleure dissipation de l'énergie que les souris répondeuses. En conséquence les souris non répondeuses utiliseraient plus d'énergie au niveau musculaire et dissiperaient plus facilement cette énergie sous forme de chaleur tandis que les souris répondeuses stockeraient l'excédent énergétique au niveau de leur tissu adipeux et dans le foie (sous forme de triglycérides notamment).

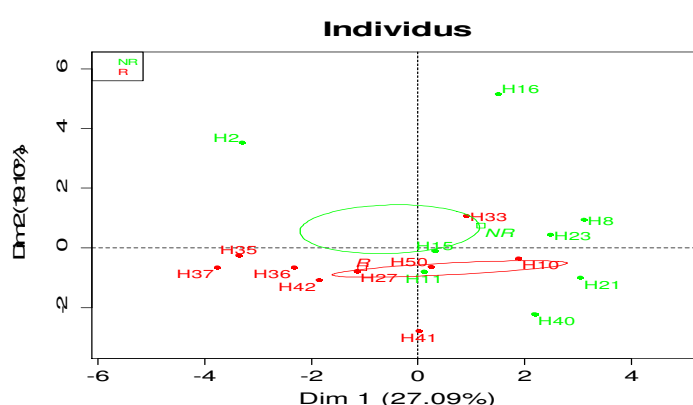


Figure 56 : Analyse en composante principale de l'expression des gènes du muscle gastrocnémien des souris NR et R. Les deux groupes ne se séparent pas sur l'ACP.

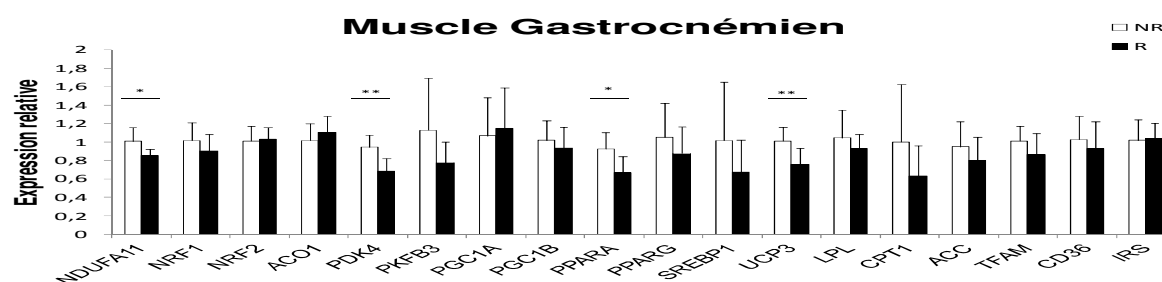


Figure 57 : Quantité relative de l'expression de gènes dans le muscle gastrocnémien. n=10 pour les NR et n=9 pour les R. NDUFA11 : $p_{NR/R}=0,024$; PDK4 : $p_{NR/R}=0,003$; PPAR- α : $p_{NR/R}=0,014$; UCP3 : $p_{NR/R}=0,01$. NDUFA11, NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex 11 ; NRF1, Nuclear respiratory factor 1 ; NRF2, Nuclear respiratory factor 2 ; ACO1, Aconitase 1 ; PDK4, Pyruvate Dehydrogenase kinase isozyme 4 ; PKFB3, phosphofructo-2-kinase/fructose-2-2-biphosphatase 3 ; PGC1A Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator ; PGC1B, Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1B ; PPAR- α , Peroxisome proliferator-activated-receptor alpha ; PPAR- γ , Peroxisome proliferator-activatedreceptor gamma ; SREBP1, Sterol element binding protein 1 ; UCP3, Mitochondrial uncoupling protein ; LPL, Lipoprotein lipase ; CPT1, Carnitine palmitoyl transferase 1 ; ACC, Acetyl Coa Carboxylase ; TFAM Transcriptional factor A mitochondrial ; CD36, Cluster of differentiation 36 ; IRS1, Insulin receptor substrat 1. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

2.5. Dosage des AGCC

Les quantités totales d'AGCC mesurées dans le caecum des souris high fat sont significativement plus faibles que celles mesurées chez les souris contrôles (Figure 58). Ainsi les quantités d'acétate de propionate, de butyrate, d'isobutyrate, d'isovalérate et de valérate sont plus élevées chez les souris contrôles que chez les souris répondeuses et non répondeuses. Cependant, les contenus caecaux des souris contrôles étant beaucoup plus importants (Figure 59), ces différences disparaissent lorsque l'on considère les concentrations caecales (Figure 60).

Ainsi, le dosage des acides gras à chaînes courtes caecaux révèle que les souris répondeuses ont une plus grande concentration de butyrate que les souris contrôles (CONT=10,21 \pm 2,03 ; R=13,31 \pm 2,26) (Figure 59). D'autre part les souris high fat (répondeuses et non répondeuses) ont une plus grande concentration d'isovalérate que les souris contrôles (CONT=2,12 \pm 0,51 ; R=3,31 \pm 0,76) (Figure 59). Cependant, nous n'observons pas de différence entre les souris répondeuses et non répondeuses pour l'ensemble des AGCC dosés, et ceci que l'on considère la quantité totale ou les concentrations (Figure 58 et 60).

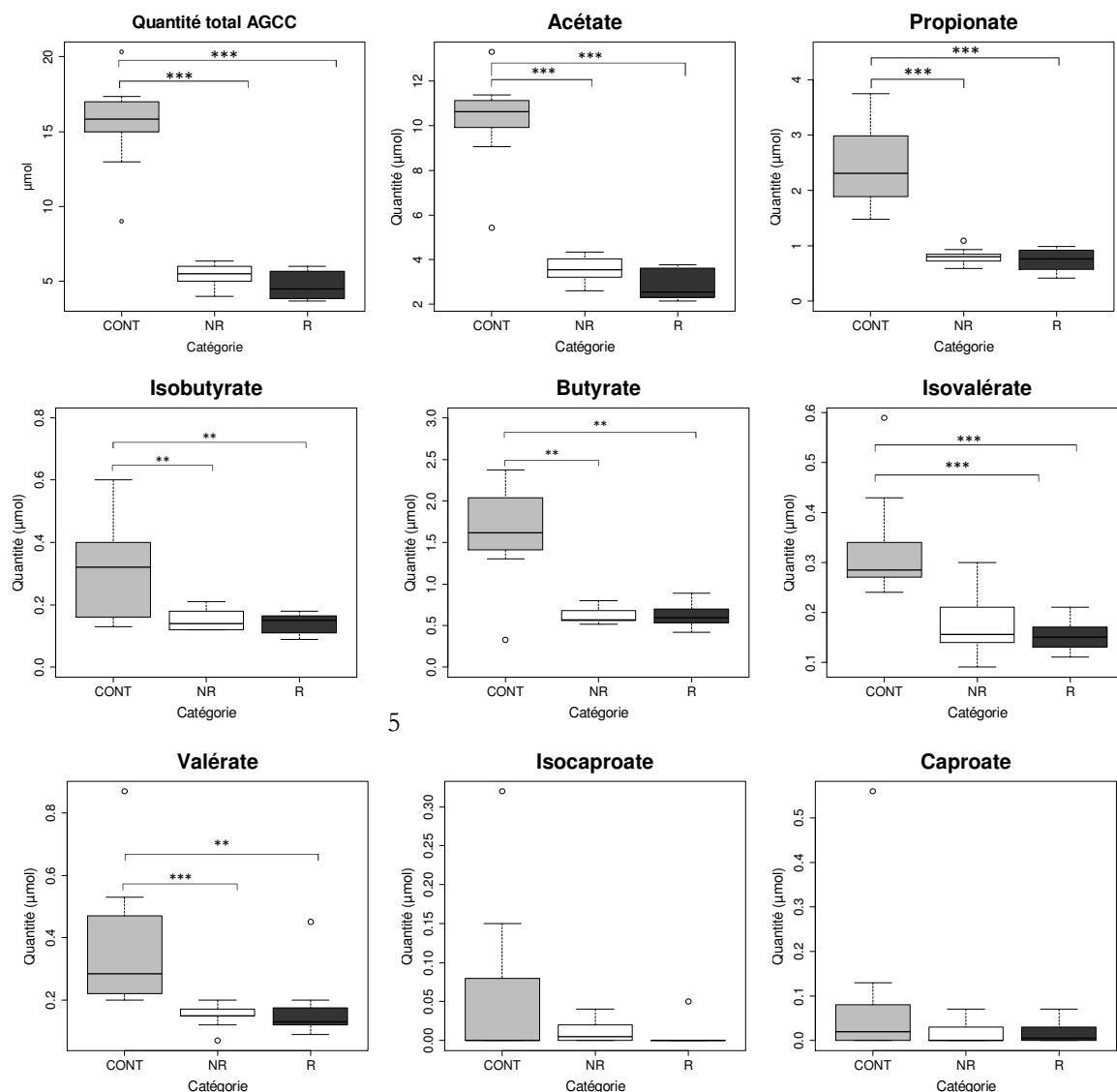


Figure 58 : Quantité (µmol) d'acides gras à chaînes courtes au niveau du caecum. n=10 pour les CONT, n=10 pour les NR et n=9 pour les R. Quantité total d'AGCC : $p_{C/NR}=0,00015$; $p_{C/R}=0,0003688$; $p_{NR/R}=0,08$. Acétate : $p_{C/NR}=0,000011$ $p_{C/R}=0,000045$; Propionate : $p_{C/NR}=0,0000108$ $p_{C/R}=0,00005$; Isobutyrate : $p_{C/NR}=0,003907$ $p_{C/R}=0,008522$; Butyrate : $p_{C/NR}=0,00246$ $p_{C/R}=0,004465$; Isovalérate : $p_{C/NR}=0,0008689$ $p_{C/R}=0,000356$; Valérate : $p_{C/NR}=0,0002547$ $p_{C/R}=0,004343$. * $p\leq0,05$, ** $p\leq0,01$, *** $p\leq0,001$.

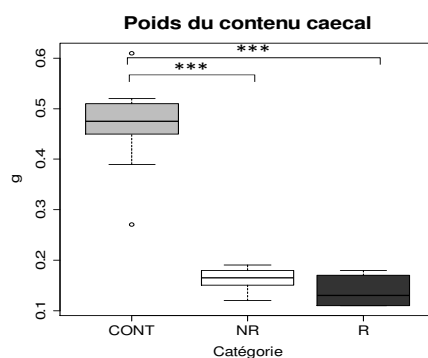


Figure 59 : Contenu caecal des 3 groupes de souris. $p_{C/NR}=0,00015$, $p_{C/R}=0,000229$ $p_{NR/R}=0,04794$. * $p\leq0,05$, *** $p\leq0,001$.

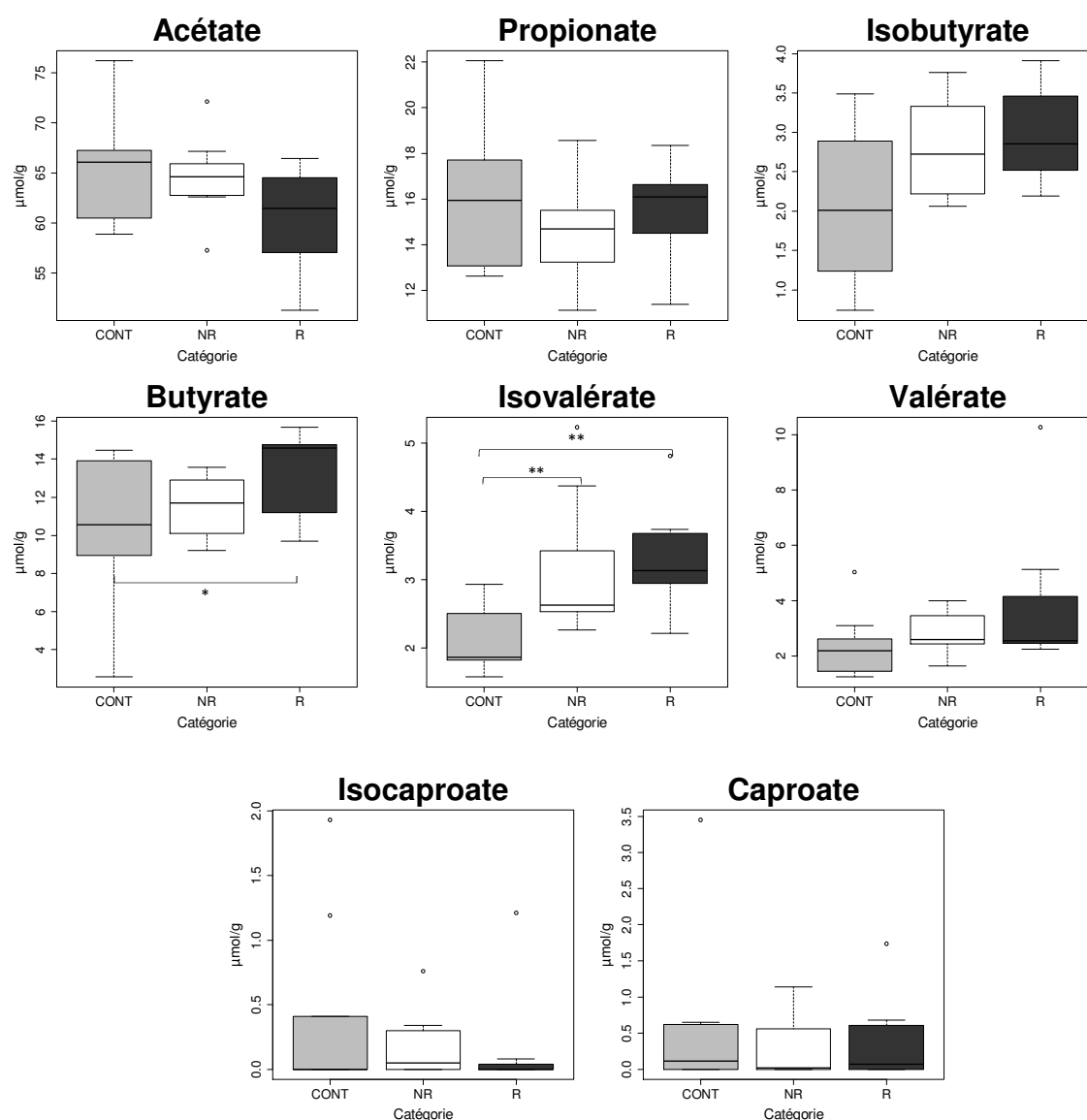


Figure 60 : Concentration (μmol/g) caecale des AGCC. n=10 pour les CONT, n=10 pour les NR et n=9 pour les R. Butyrate : $p_{C/R} = 0,0234$ Isovalérate : $p_{C/NR} = 0,01005$; $p_{C/R} = 0,002857$. * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

2.6. Dosage des lipides plasmatiques

Le dosage des lipides plasmatiques a été effectué sur les 3 groupes de souris : contrôles, non répondeuses et répondeuses.

Le dosage des triglycérides plasmatiques ne révèle aucune différence entre les trois groupes de souris (CONT=44,37 \pm 4,88 ; NR=44,43 \pm 7,24 ; R=47,74 \pm 12,51) (Figure 61). Le régime hyperlipidique n'a donc pas induit d'hypertriglycéridémie.

Le dosage des acides gras libres révèlent une différence entre les souris contrôles et les non répondeuses (CONT= 0,66 \pm 0,16 ; NR= 0,51 \pm 0,12 ; R= 0,60 \pm 0,22) mais aucune différence entre les répondeuses et non répondeuses (Figure 61).

Le dosage du cholestérol libre révèle une différence entre les souris high fat et les souris contrôles mais pas entre les souris répondeuses et non répondeuses (CONT=0,17 \pm 0,05 ; NR=0,50 \pm 0,16 ; R=0,52 \pm 0,08) (Figure 61). En revanche la concentration du cholestérol total est plus élevée chez les souris répondeuses que chez les souris non répondeuses (CONT=0,46 \pm 0,14 ; NR=1,38 \pm 0,24 ; R=2,13 \pm 0,42) (Figure 61). De plus les souris contrôles ont une plus faible concentration de cholestérol total que les souris high fat. Le régime hyperlipidique a donc favorisé l'augmentation de la concentration de cholestérol plasmatique total et libre.

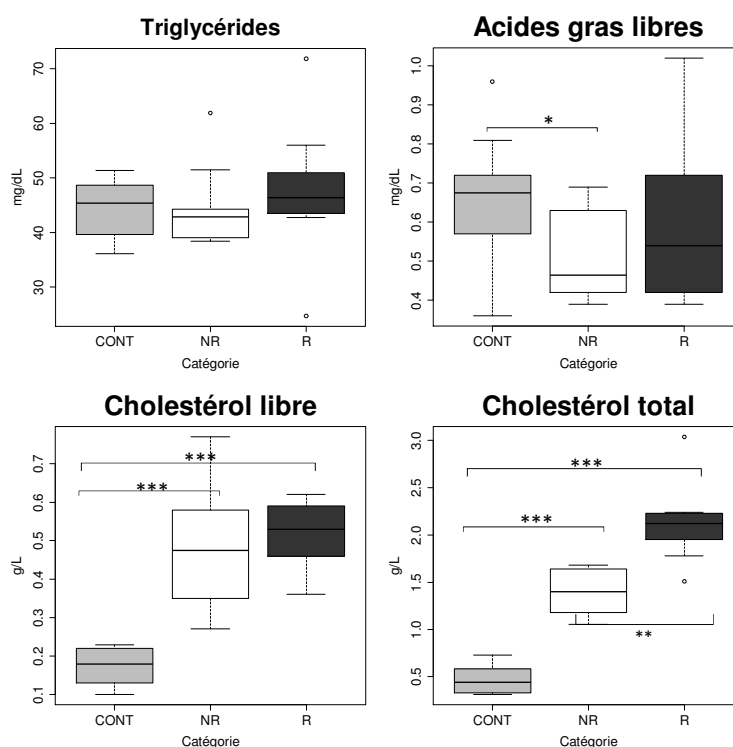


Figure 61 : Dosage plasmatique des triglycérides, des acides gras libres et du cholestérol. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

2.7. Dosage des Lipopolysaccharides (LPS)

Le dosage des LPS a été réalisé sur les 3 groupes de souris contrôles, répondeuses et non répondeuses (Figure 62). Cependant, il est à noter qu'une seule souris contrôle a été utilisée pour réaliser le dosage ainsi que 7 souris non répondeuses et 7 souris répondeuses. Aucune différence statistique n'est observée entre les 3 groupes de souris mais nous constatons par ailleurs une grande variabilité des concentrations de LPS chez les souris répondeuses et non répondeuses. Les souris répondeuses ayant une gamme de concentration comprise entre 4,3 UE/ml et 229 UE/ml et les souris non répondeuses entre 1,5 UE/ml et 357 UE/ml. Le développement du phénotype répondeur ne semble pas donc être dû à une augmentation de la concentration de LPS plasmatique.

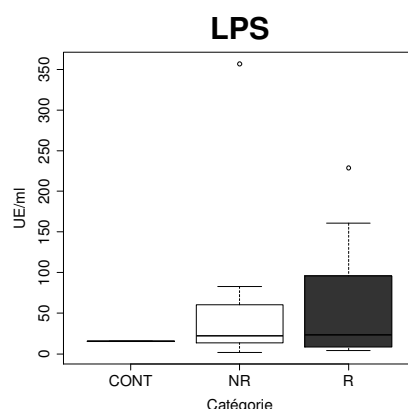


Figure 62 : Dosage du LPS plasmatique. Il n'y a pas de différence entre les 3 groupes de souris mais on remarque une grande variabilité au sein des groupes répondeurs et non répondeurs.

3. Hybridation *in situ* en fluorescence couplée à la cytométrie en flux.

Les analyses de FISH-FCM ont porté sur les souris répondeuses et non répondeuses mais n'ont pas incorporé les souris contrôles. Nous souhaitions visualiser si il existe des différences de composition de microbiote entre les répondeuses et les non répondeuses une semaine avant (s-1) et 12 semaines (s+12) après la prise du régime hyperlipidique.

Les analyses de FISH-FCM ne permettent pas de mettre en évidence une différence de composition de microbiote entre le groupe des individus non répondeurs et le groupe des individus répondeurs avant l'administration du régime hyperlipidique. Nous ne pouvons donc pas prédire le statut de répondeur ou de non répondeur sur la base de cette analyse.

L'administration du régime hyperlipidique chez le groupe non répondeur entraîne une diminution de la proportion des bactéries appartenant aux genres *Bifidobacterium* (*Actinobacteria*) s-1 : $12,07 \pm 5,6\%$; s+12 : $4,67 \pm 1,60\%$, *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*) (s-1 : $0,24 \pm 0,22\%$; s+12 : $0,04 \pm 0,13\%$) et une augmentation de la proportion de bactéries appartenant à la classe des *Erysipelotrichi* (*Firmicutes*) (s-1 : $0,95 \pm 0,80\%$; s+12 : $5,77 \pm 3,72\%$) (Figure 63).

La prise du régime hyperlipidique chez le groupe répondeur entraîne une diminution de la proportion de bactéries appartenant au groupe *Clostridium coccoides* (s-1 : $36,03 \pm 11,08$; s+12 : $18,94 \pm 6,90$), aux genres *Bacteroides* & *Prevotella* (*Bacteroidetes*) (s-1 : $11,89 \pm 6,20\%$; s+12 : $3,70 \pm 1,49\%$), *Enterobacteriaceae* (*Proteobacteria*) ($0,36 \pm 0,27\%$; $0,03 \pm 0,07\%$), *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weissella* & *Pediococcus* (*Firmicutes*) (s-1 : $7,95 \pm 2,50$; s+12 : $3,15 \pm 1,17$), *Bifidobacterium* (*Actinobacteria*) (s-1 : $8,90 \pm 2,30\%$; s+12 : $4,5 \pm 1,4\%$) ainsi que *Mouse intestinal bacteria* (*Bacteroidetes*) (s-1 : $15,08 \pm 7,65$; s+12 : $1,36 \pm 0,99$) (Figure 63).

La comparaison des microbiotes des groupes répondeurs et non répondeurs 12 semaines après le début du régime hyperlipidique, met en évidence une plus grande proportion de la classe des *Erysipelotrichi* (*Firmicutes*) chez les NR (NR : $5,77 \pm 3,72$; R : $1,30 \pm 0,68$) (Figure 63). Nous constatons par ailleurs que cette classe est la seule dont la proportion augmente entre le début et la fin de l'expérimentation et ce uniquement chez les NR. Chez la souris, il a été montré qu'un régime riche en lipides favorise une augmentation de cette classe (Turnbaugh, et coll. 2008; Turnbaugh et coll. 2010). Au regard de nos résultats, nous pouvons supposer que l'augmentation de la proportion de cette classe suite à un régime hyperlipidique aurait un effet protecteur face à une obésité induite, ou du moins, que cette augmentation participerait à la limitation du développement de l'obésité chez la souris NR.

Nous observons par ailleurs une diminution de l'additivité des sondes sur le microbiote des deux groupes de souris après le régime hyperlipidique. L'additivité des sondes correspond à la somme des proportions de tous les groupes bactériens ciblés avec notre panel de 9 sondes. Avant le début du régime hyperlipidique, l'additivité des sondes est de $81,01 \pm 9,15\%$ pour les souris non répondeuses et $87,45 \pm 9,75\%$ pour les souris répondeuses. Après le régime hyperlipidique on constate une additivité moyenne de $50,24 \pm 10,76\%$ pour les souris non répondeuses et de $36,06 \pm 8,43\%$ pour les souris répondeuses (Figure 63). Cette diminution de l'additivité des sondes peut s'expliquer par le fait que le microbiote des souris sous régime hyperlipidique subit des changements de composition (Serino Gut 2012), et que, par conséquent, de nouvelles espèces

ou de nouveaux groupes taxonomiques non ciblées peuvent apparaître. Cela peut être également dû à une moindre hybridation des sondes en raison de la forte concentration en lipides du régime.

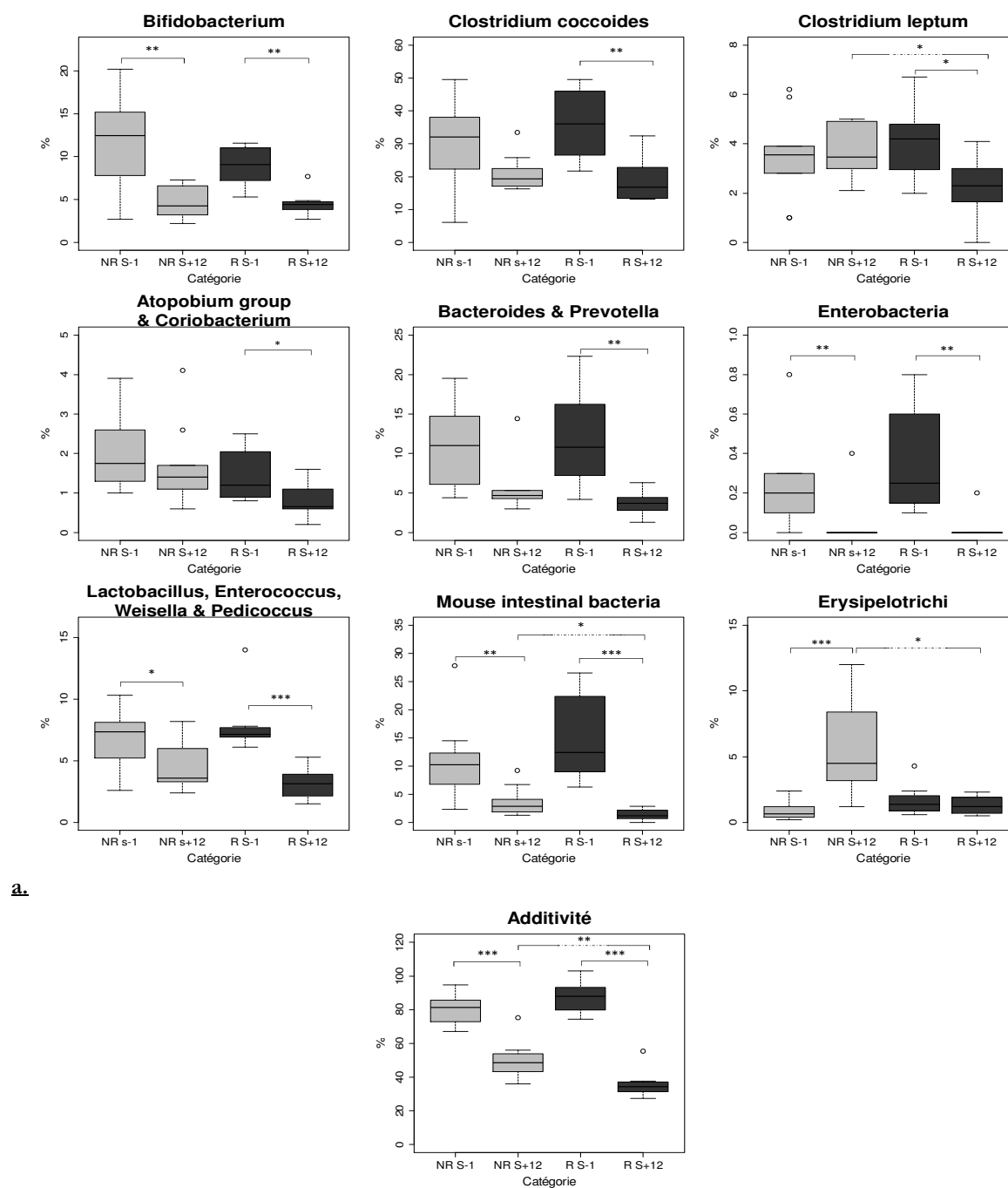


Figure 63 : a. FISH-FCM. n=10 pour les NR et n=8 pour les R. *Bifidobacterium* : $p_{NR\ s-1/NR\ s+12}=0,003886$ $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,001948$; *Clostridium coccoides* : $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,007406$; *Clostridium leptum* : $p_{NR\ s+12/R\ s+12}=0,02332$ $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,02385$; *Atopobium* & *Coriobacterium* : $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,02674$; *Bacteroides* & *Prevotella* : $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,001948$; *Enterobacteria* : $p_{NR\ s-1/NR\ s+12}=0,003512$ $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,001706$; *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Weisella* & *Pedococcus* : $p_{NR\ s-1/NR\ s+12}=0,0307$ $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,000931$; Mouse intestinal bacteria : $p_{NR\ s-1/NR\ s+12}=0,002879$ $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,0009391$ $p_{NR\ s+12/R\ s+12}=0,01445$; *Erysipelotrichi* : $p_{NR\ s-1/NR\ s+12}=0,0003772$ $p_{NR\ s+12/R\ s+12}=0,0016$ b. Additivité. $p_{NR\ s-1/NR\ s+12}=0,00007578$ $p_{R\ s-1/R\ s+12}=0,000931$ $p_{NR\ s+12/R\ s+12}=0,008729$.

4. Métagénomique

Les analyses de métagénomique ont été effectuées en collaboration avec Emmanuelle Le Chatelier de MetaGenoPolis (Démonstrateur préindustriel, INRA, Jouy-en-Josas).

7 souris répondeuses et 7 souris non répondeuses ont été sélectionnées afin d'être analysées en métagénomique. Ces souris ont été sélectionnées selon leurs coordonnées sur l'ACP (Figure 43). Les 7 souris répondeuses situées à l'extrémité droite de l'ACP et les 7 souris non répondeuses situées à l'extrémité gauche de l'ACP ont ainsi été choisies. Les fèces de chaque groupe de 7 souris ont été prélevées avant et après régime hyperlipidique, ce qui nous donne 28 échantillons au total.

A l'issu du séquençage, une moyenne de 49 millions de reads par échantillons ont été obtenus (± 13 millions) (les reads sont de courtes séquences d'environ 50 pbs).

4.1. Comptage de gènes

Le nombre de reads moyen par échantillon après séquençage est de 49 millions (± 13 millions). Une première étape permet de sélectionner les reads ayant une bonne qualité de séquence ce qui amène à une moyenne de 32 millions de reads par échantillon (± 10 millions). Les reads sont ensuite mappés sur le catalogue du métagénome de la souris ce qui amène le nombre de reads dits « mappés » moyen par échantillons à 10 millions (± 4 millions). Les reads mappés uniquement sur un seul gène sont alors sélectionnés ce qui permet de sélectionner 8 millions (± 3 millions) de reads mappés dits « unique » par échantillon. Le nombre de gènes mappés par un seul read est ensuite compté, ce qui amène une moyenne de 460 000 gènes par échantillon (± 85 000).

Le comptage des gènes issus de la projection des reads (courtes séquence de 50pbs) sur le catalogue du métagénome de la souris a été effectué sur l'ensemble des échantillons. Le comptage de gène a ensuite été normalisé sur l'échantillon ayant la plus faible profondeur de séquençage (3,6 millions de reads mappés). L'administration du régime hyperlipidique fait apparaître une tendance à l'enrichissement en nombres de gènes du microbiome aussi bien chez les souris répondeuses que chez les souris non répondeuses (Figure 64) bien que cette augmentation ne soit pas significative. Par ailleurs, le nombre de gènes présents dans les microbiomes des souris répondeuses et non répondeuses est similaire, aussi bien avant qu'après l'administration du régime hyperlipidique.

La clusterisation des gènes (cf. Matériel & Méthode §8.8) et le comptage des MGS qui en découle permet d'observer une augmentation significative du nombre de MGS (et donc du nombre d'espèces) par l'effet du régime (Figure 64). Le nombre de MGS est plus élevé à la fin du régime hyperlipidique qu'avant pour les deux groupes de souris. Le régime hyperlipidique semble donc provoquer un enrichissement du nombre d'espèces chez les souris répondeuses et non

répondeuses. Le comptage des MGS a été normalisé sur l'échantillon ayant une des plus faibles profondeurs de séquençage (4,4 millions de reads).

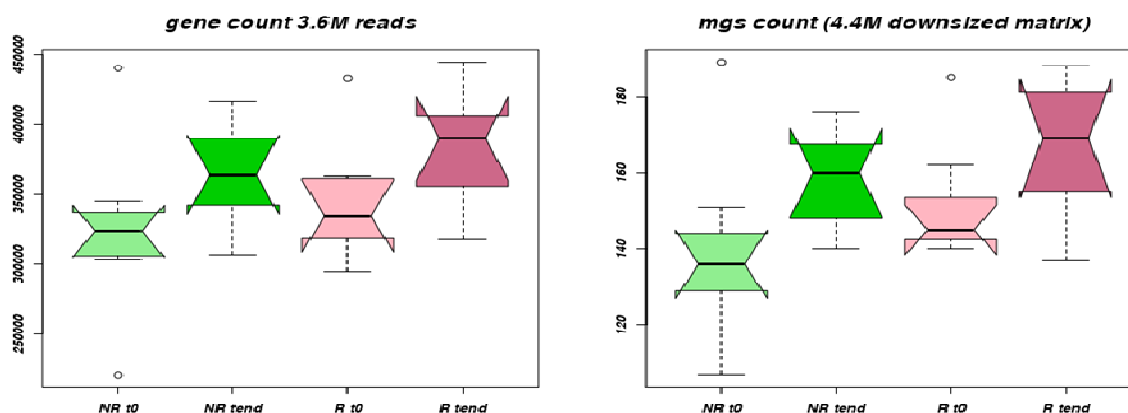


Figure 64 : Comptage des gènes des souris répondeuses et non répondeuses. **a.** Le nombre de gènes est identique entre les deux groupes de souris avant et après régime hyperlipidique. Il y a cependant une tendance à l'augmentation (non significative) du nombre de gènes. **b.** Le comptage des MGS laisse apparaître un enrichissement significatif du nombre de MGS entre le début et la fin du régime ($p=0,033$). NR t0 : groupe non répondeur 1 semaine avant le régime hyperlipidique, R t0 : groupe répondeur 1 semaine avant le régime hyperlipidique, NR tend : groupe non répondeur 12 semaines après le début du régime hyperlipidique, R tend : groupe répondeur 12 semaines après le début du régime hyperlipidique.

4.2. Regroupement hiérarchique

En utilisant le catalogue du métagénome de la souris de 2.6 millions de gènes, le regroupement hiérarchique des 28 échantillons (7 souris NR, 7 souris R, 1 semaines avant et 12 semaines après le régime hyperlipidique) discrimine les souris en deux groupes très distincts (Figure 65). Le premier groupe rassemble l'ensemble des échantillons prélevés avant administration du régime hyperlipidique (en rose et vert clair sur la figure 65) tandis que le deuxième groupe rassemble l'ensemble des échantillons prélevés après le régime hyperlipidique (en violet et vert foncé sur la figure 65). Au sein de chaque groupe, les échantillons NR et R ne sont pas séparés. Cette non séparation des individus NR et R est confirmée lorsque l'analyse est effectuée séparément sur les échantillons prélevés avant et après l'administration du régime hyperlipidique (Figure 65). Ceci indique que les gènes présents dans le microbiome des souris sont différents avant et après régime hyperlipidique mais que cette composition en gènes ne permet pas de distinguer les individus NR et R que ce soit avant ou après administration du régime.

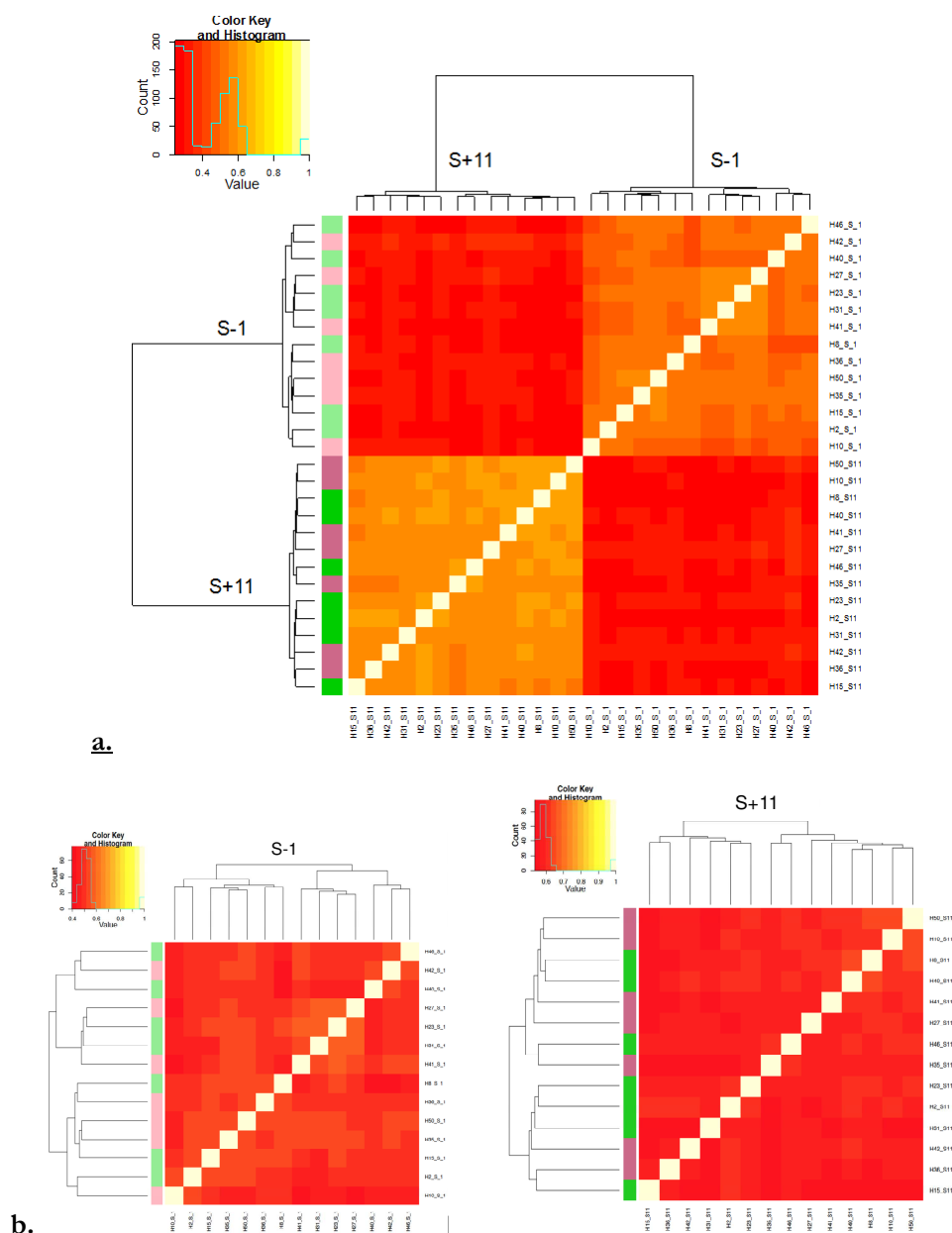


Figure 65 : Clusterisation Ascendante Hiérarchique des 28 échantillons (Corrélation de Spearman et méthode de Ward) sur la base du catalogue de 2,6 millions de gènes. a. Les souris se clusterisent par effet temps. **b.** En considérant les deux temps séparément (s-1 et s+12), la clusterisation ascendante hiérarchique ne permet pas de séparer les souris répondeuses et les souris non répondeuses. Sur la gauche de chaque graphique est représentée l'appartenance de groupe de l'échantillon : en vert clair : NR avant régime, en rose clair : R avant régime, en vert foncé NR après régime, en violet : R après régime. Les corrélations entre individus sur le graphique sont représentées comme un gradient du rouge au jaune : rouge : aucune corrélation entre les échantillons, jaune corrélation complète entre les échantillons.

Les gènes présents dans les 28 échantillons ont été clusterisés en fonction de leurs profils d'abondance dans chacun des individus : ce sont les MGS. Les MGS sont donc des clusters de gènes correspondant à une ou plusieurs souches d'une ou plusieurs espèces ayant la même co-variance entre les individus. On parle de MGS (MetaGenomic Species) lorsque le cluster regroupe plus de 500 gènes, et on parle de CAG (Cluster of Orthologous Group) pour des clusters regroupant moins de 500 gènes. Ces clusters de gènes sont également appelés méta-espèces.

En utilisant les gènes clusterisés en MGS (281 MGS), le regroupement hiérarchique des 28 échantillons discrimine les souris en deux groupes distincts (Figure 66). L'effet du régime hyperlipidique est clairement visible étant donné que nous observons qu'un premier groupe rassemble l'ensemble des échantillons prélevés avant administration du régime hyperlipidique (en rose et vert clair sur la figure 66) tandis que le deuxième groupe rassemble l'ensemble des échantillons prélevés après le régime hyperlipidique (en violet et vert foncé sur la figure 66). Au sein de chaque groupe, les échantillons NR et R ne sont pas séparés. Cette non séparation des individus NR et R est confirmée lorsque l'analyse est effectuée séparément sur les échantillons prélevés avant et après l'administration du régime hyperlipidique (Figure 66). Ceci indique que les espèces présentes dans le microbiome des souris sont différentes avant et après régime hyperlipidique, ce qui est en accord avec les recherches dans ce domaine puisqu'il est connu qu'un régime hyperlipidique modifie la composition du microbiote (Serino Gut 2012). Cependant, cette composition en espèces ne permet pas de distinguer les individus NR et R que ce soit avant ou après administration du régime.

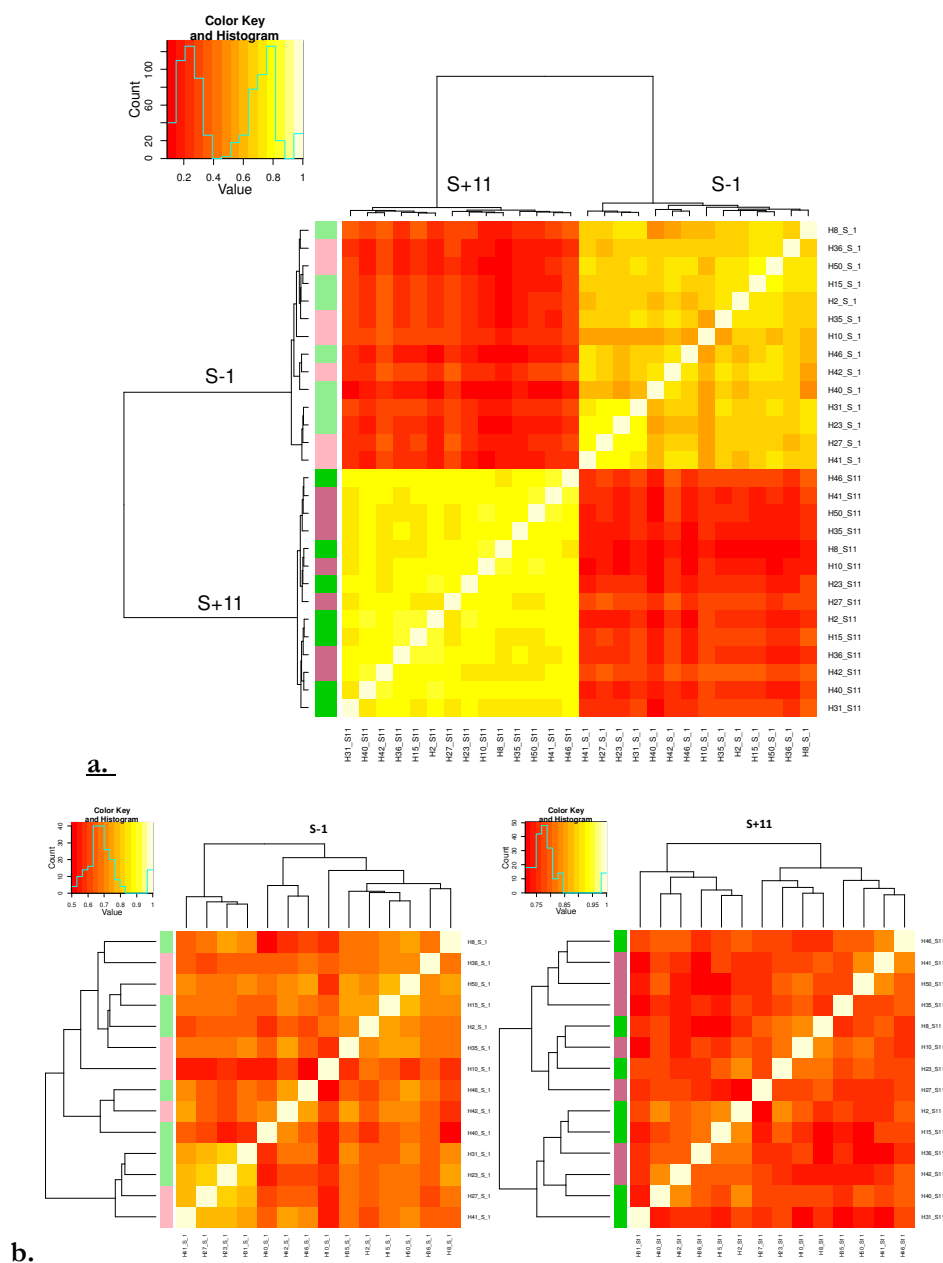


Figure 66 : Clusterisation Ascendante Hiérarchique des 28 échantillon analysés (Corrélation de Spearman et méthode de Ward) sur la base des MGS. a. Les souris se clusterisent par effet du temps. **b.** En considérant les deux temps séparément (s-1 et s+12), la clusterisation ascendante hiérarchique ne permet pas de séparer les souris répondeuses et les souris non répondeuses. Sur la gauche de chaque graphique est représentée l'appartenance de groupe de l'échantillon : en vert clair : NR avant régime, en rose clair : R avant régime, en vert foncé NR après régime, en violet: R après régime. Les corrélations entre individus sur le graphique sont représentées comme un gradient du rouge au jaune : rouge : aucune corrélation entre les échantillons, jaune corrélation complète entre les échantillons.

4.3. Comparaison du nombre de gènes

Le comptage des gènes au sein des 4 groupes révèle que le nombre de gènes moyen par échantillon est de 460 000 gènes (\pm 85 000). La recherche de différences d'abondance de gènes (test de wilcoxon à $p=0,05$) a été faite pour les 4 groupes (Tableau 11). Nous constatons ainsi que les différences d'abondance de gènes sont dues principalement au régime hyperlipidique : 313 649 gènes différentiellement abondants pour les NR entre l'avant et l'après régime et 307 516 gènes différentiellement abondants pour les R entre l'avant et l'après régime. Par ailleurs, 16103 gènes sont différentiellement abondants entre les deux groupes répondeurs et non répondeurs avant le régime hyperlipidique et 23161 le sont après le régime (Tableau 11). La différence d'abondance de gènes au sein des deux groupes étant donc principalement due à l'effet du régime ceci explique pourquoi la différence entre NR et R n'apparaît pas dans la classification ascendante hiérarchique (Figure 65).

Analyse	Nb de gènes différentiellement abondants
NR vs R avant régime high fat	16 103
NR avant vs NR après régime high fat	313 649
R avant vs R après régime high fat	307 516
NR vs R après régime high fat	23 161

Tableau 11 : Comparaison des abondances de gènes entre les quatre groupes de souris. La majeure partie des différences d'abondances de gènes est due à l'administration du régime hyperlipidique.

4.4. Identification des fonctions

L'ensemble des gènes présents dans les 28 échantillons a été projeté sur les clusters de fonctions (COG, NOG, KO). Le signal de chaque cluster est calculé sur la somme des signaux de l'ensemble des gènes contenus dans cluster ($p \leq 0,05$) puis les clusters de fonctions obtenus sont testés pour leur différence d'abondance entre les deux groupes avant et après l'administration du régime hyperlipidique (Tableau 12). Nous obtenons ainsi respectivement 264 clusters de fonctions différenciellement abondants chez les non répondeuses et chez les répondeuses avant l'administration du régime hyperlipidique avec 79 clusters plus abondant chez les non répondeuses et 185 clusters plus abondant chez les répondeuses. Par ailleurs, il y a 487 clusters de fonctions différenciellement abondants chez les non répondeuses et chez les répondeuses après l'administration du régime hyperlipidique dont 381 clusters plus abondant chez les non répondeuses et 106 clusters plus abondant chez les répondeuses.

Les analyses sur l'effet du régime hyperlipidique donnent 8265 clusters différenciellement abondants chez les non répondeurs et 7708 clusters différenciellement abondant chez les répondeurs par effet du régime. Dans le Tableau 12 sont représentées les 24 premières lignes de la comparaison NR/R avant régime hyperlipidique au seuil de $p=0,05$.

Nom du cluster	taille	p.NR_R.t0	q.NR_R.t0	Abondance	Catégorie fonctionnelle	Description
bactNOG2229	1	1,2E-03	0,982	R.t0	L	DNA polymerase III, epsilon subunit
K12141	13	1,7E-03	0,982	R.t0	hyfF	hydrogenase-4 component F [EC:1.1.1.1]
COG4990	37	2,1E-03	0,982	R.t0	S	Uncharacterized protein conserved in bacteria
NOG68413	2	2,2E-03	0,982	R.t0	NA	
NOG11725	9	2,3E-03	0,982	NR.t0	S	
firmNOG0749	1	3,2E-03	0,982	R.t0	S	
NOG119216	40	3,7E-03	0,982	R.t0	S	
NOG44341	9	4,1E-03	0,982	R.t0	S	
bactNOG0398	1	4,1E-03	0,982	NR.t0	T	Methyl-Accepting chemotaxis protein
NOG272112	8	4,9E-03	0,982	R.t0	NA	
COG0181	85	6,1E-03	0,982	R.t0	H	Porphobilinogen deaminase
NOG287216	1	6,4E-03	0,982	NR.t0	NA	
bactNOG0511	1	6,4E-03	0,982	R.t0	O	Methionine sulfoxide reductase
NOG138354	6	6,4E-03	0,982	NR.t0	S	Ribosomal protein S17
NOG82853	30	6,4E-03	0,982	R.t0	S	
COG1566	27	6,7E-03	0,982	R.t0	V	Multidrug resistance efflux pump
KU/1/2	33	7,0E-03	0,982	R.t0	KU/1/2	antitoxin
K03716	93	7,0E-03	0,982	R.t0	spB	spore photoproduct lyase [EC:4.1.99.14]
COG3547	1008	7,0E-03	0,982	R.t0	L	Transposase and inactivated derivatives
NOG124415	4	7,0E-03	0,982	R.t0	S	
NOG79887	7	7,0E-03	0,982	R.t0	U	Preprotein translocase, SecE subunit
bactNOG637	5	9,5E-03	0,982	NR.t0	L	RNA helicase
K00076	117	9,5E-03	0,982	R.t0	hdhA	7-alpha-hydroxysteroid dehydrogenase [EC:1.1.1.159]
NOG315608	1	9,5E-03	0,982	NR.t0	NA	

Tableau 12 : Comparaison des clusters de fonctions des souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique. Les données sont organisées de la façon suivante : 1^{ère} colonne : Le nom du cluster ; 2^{ème} colonne : Le nombre de gènes dans le cluster fonctionnel ; 3^{ème} et 4^{ème} colonne : la p-valeur et la q-valeur du test de Wilcoxon ; 5^{ème} colonne : Groupe d'échantillon dans lequel le cluster est le plus abondant à t0. R_t0, le cluster est plus abondant chez les souris répondeuses avant le régime hyperlipidique. NR_t0 le cluster est plus abondant chez les souris non répondeuses avant le régime hyperlipidique ; 6^{ème} colonne : Catégorie fonctionnelle du cluster ; 7^{ème} colonne : Description de la fonction du cluster.

Nous nous sommes par la suite intéressés aux fonctions des clusters COG, NOG et KOG. Les fonctions de ces clusters sont regroupées au sein de catégories codées par une lettre, ce qui facilite la synthèse et l'interprétation des données. Les clusters KEGG (dénommés KO) n'ont pas ce type de codage ce qui rend les analyses et l'interprétation nettement plus compliquée. Le nombre de clusters de fonctions analysés est donc légèrement diminué.

Comme nous venons de le dire, les clusters de fonctions COG, NOG et KOG sont organisés selon une classification à une lettre permettant l'accès aux différentes catégories de fonctions des clusters. Par exemple, la lettre « L » correspond aux fonctions de réplication et de réparation de l'ADN, la lettre « K » faisant référence aux fonctions de transcription. En se basant sur cette organisation, nous avons comparé les fonctions portées par les clusters différentiellement représentés entre les deux groupes avant le régime hyperlipidique. L'analyse des fonctions des gènes entre les deux groupes de souris révèle ainsi que 209 clusters fonctionnels COG sont différentiellement abondants entre les souris répondeuses et non répondeuses avant l'administration du régime hyperlipidique : 152 clusters fonctionnels sont plus abondants chez les souris du groupe répondeuses et 57 clusters sont plus abondants chez les souris non répondeuses. Nous constatons donc qu'au niveau des fonctions différentiellement représentées entre les deux groupes, il existe une plus forte représentation des clusters de fonction chez le groupe de souris répondeuses. Sur la base de cette analyse, les fonctions prédominantes chez les souris répondeuses sont des fonctions impliquées dans des fonctions de réplication, de transcription et de traduction ainsi que de production d'énergie (Figure 67) ce qui pourrait peut-être traduire une activité de “division” plus active de la part des bactéries du microbiote des souris répondeuses.

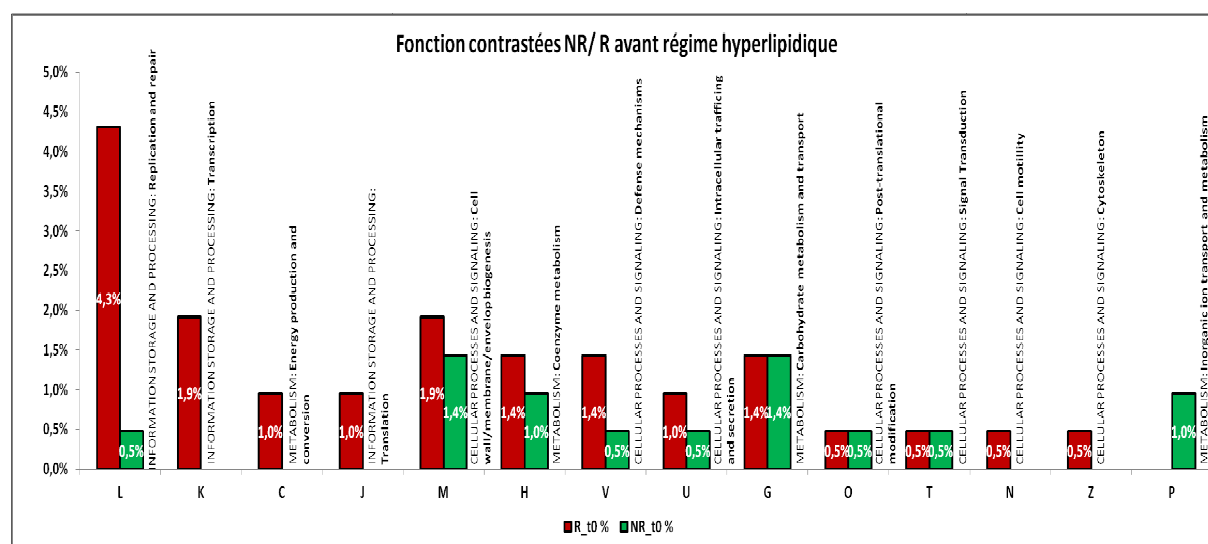


Figure 67 : Représentation graphique des fonctions contrastées entre souris répondeuses et souris non répondeuses une semaine avant le régime hyperlipidique.

4.5. Analyse taxonomique

4.5.1. Comparaison NR/R

La clusterisation des gènes en méta-espèces permet d'effectuer des analyses taxonomiques sur les 28 échantillons. La comparaison des phyla et des genres entre les souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique ne permet pas d'observer de différences de composition taxonomique (Figure 68) entre les deux groupes. Nous ne pouvons donc pas définir une composition de microbiote permettant de prédire la distinction NR/R à ce niveau.

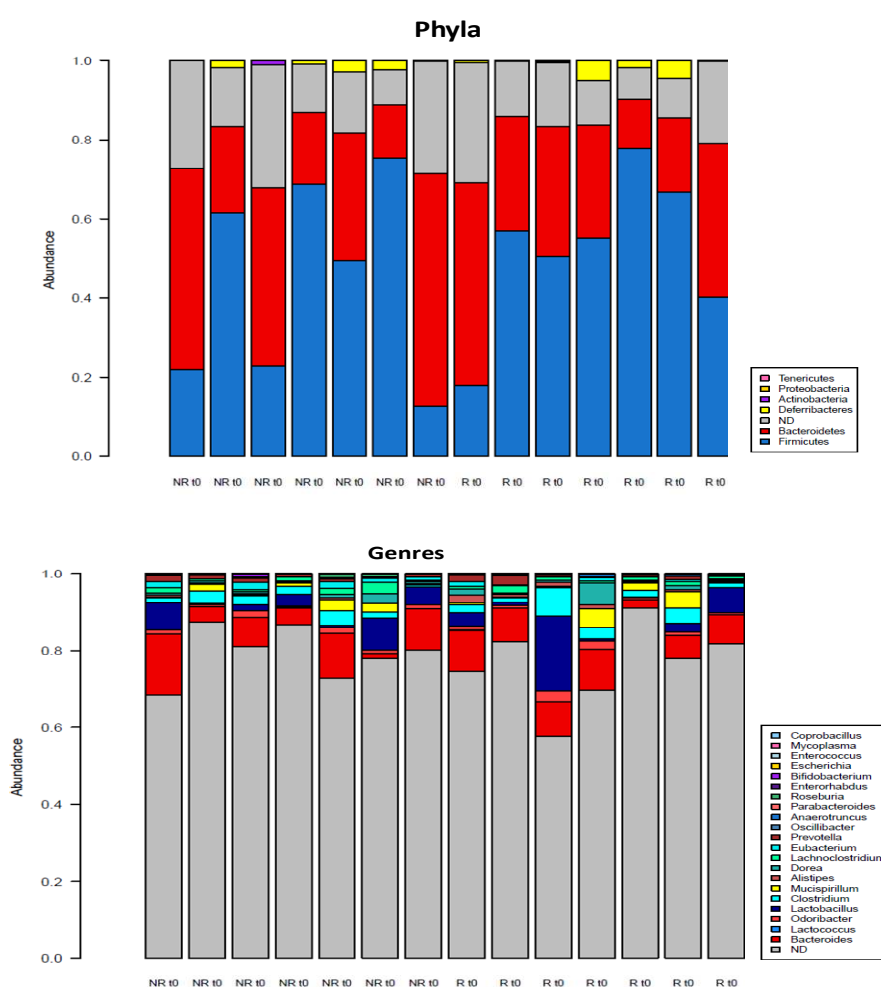


Figure 68 : Analyse taxonomique du microbiote intestinal des souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique. Nous n'observons pas de distinction taxonomique de la composition du microbiote au niveau des phyla et des genres.

Nous observons cependant une différence de proportion, bien que non significative, entre les deux groupes sur le genre *Eubacterium* avant l'administration du régime hyperlipidique (Figure 69). Ainsi le genre *Eubacterium* tend à être plus important chez les souris non répondeuses avant régime hyperlipidique. Cette différence est la plus marquée que l'on puisse observer. A titre de comparaison, est représenté le genre *Lachnospirillum* (Figure 69) pour lequel il n'existe pas de différence d'abondance entre les deux groupes. D'autre part, le régime hyperlipidique tend à diminuer la proportion d'*Eubacterium* au sein des deux groupes.

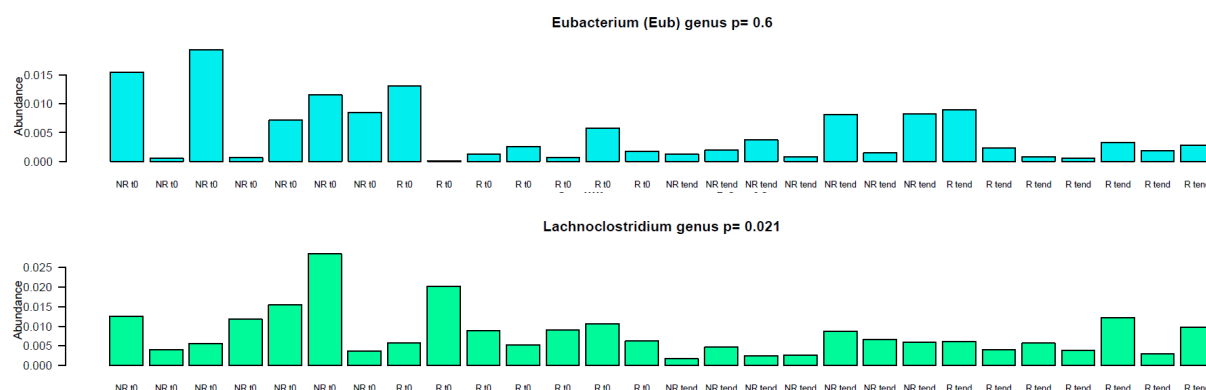


Figure 69 : Abondance des gènes du genre *Eubacterium* et *Lachnospirillum* dans les 28 échantillons analysés. Bien que non significatif l'abondance du genre *Eubacterium* avant le régime hyperlipidique est la différence la plus marquée entre les souris répondeuses et non répondeuses que l'on puisse observer à ce niveau. Le genre *Lachnospirillum* est présenté ici à titre d'exemple de comparaison.

4.5.2. Effet du régime

L'analyse taxonomique de l'ensemble des individus révèle que le régime hyperlipidique a tendance à homogénéiser la composition des microbiotes au niveau des phyla (Figure 70). On observe en effet qu'avant le régime hyperlipidique certaines souris (répondeuses et non répondeuses) ont une plus faible proportion de *Firmicutes* et une plus grande proportion de *Bacteroidetes* que le reste des souris et qu'après le régime, ces différences s'amointrissent et le que le ratio *Firmicutes/Bacteroidetes* tend à augmenter. Par ailleurs, le régime hyperlipidique impacte la composition phylogénétique du microbiote au niveau des genres et à pour conséquence une augmentation des bactéries appartenant notamment aux genres *Lactococcus*, *Odoribacter* et *Alistipes* (Figure 70).

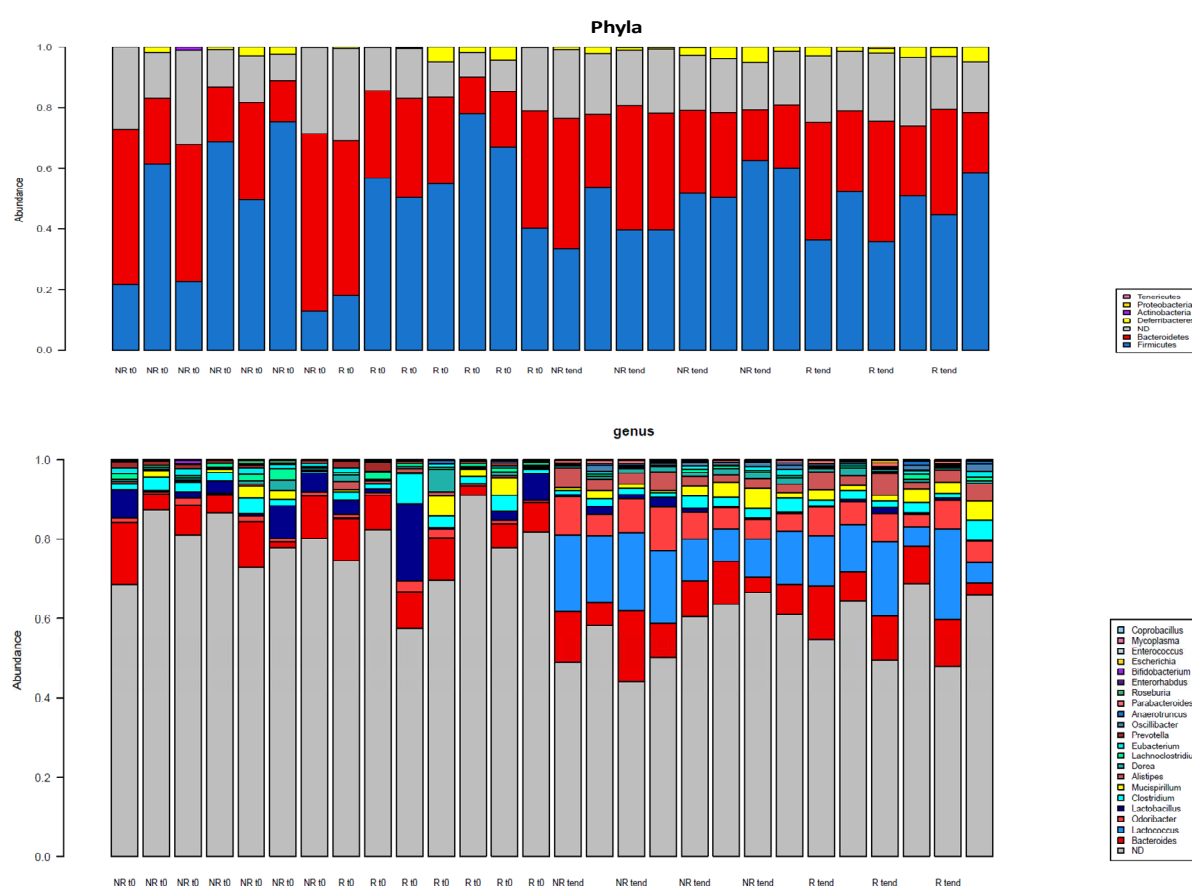
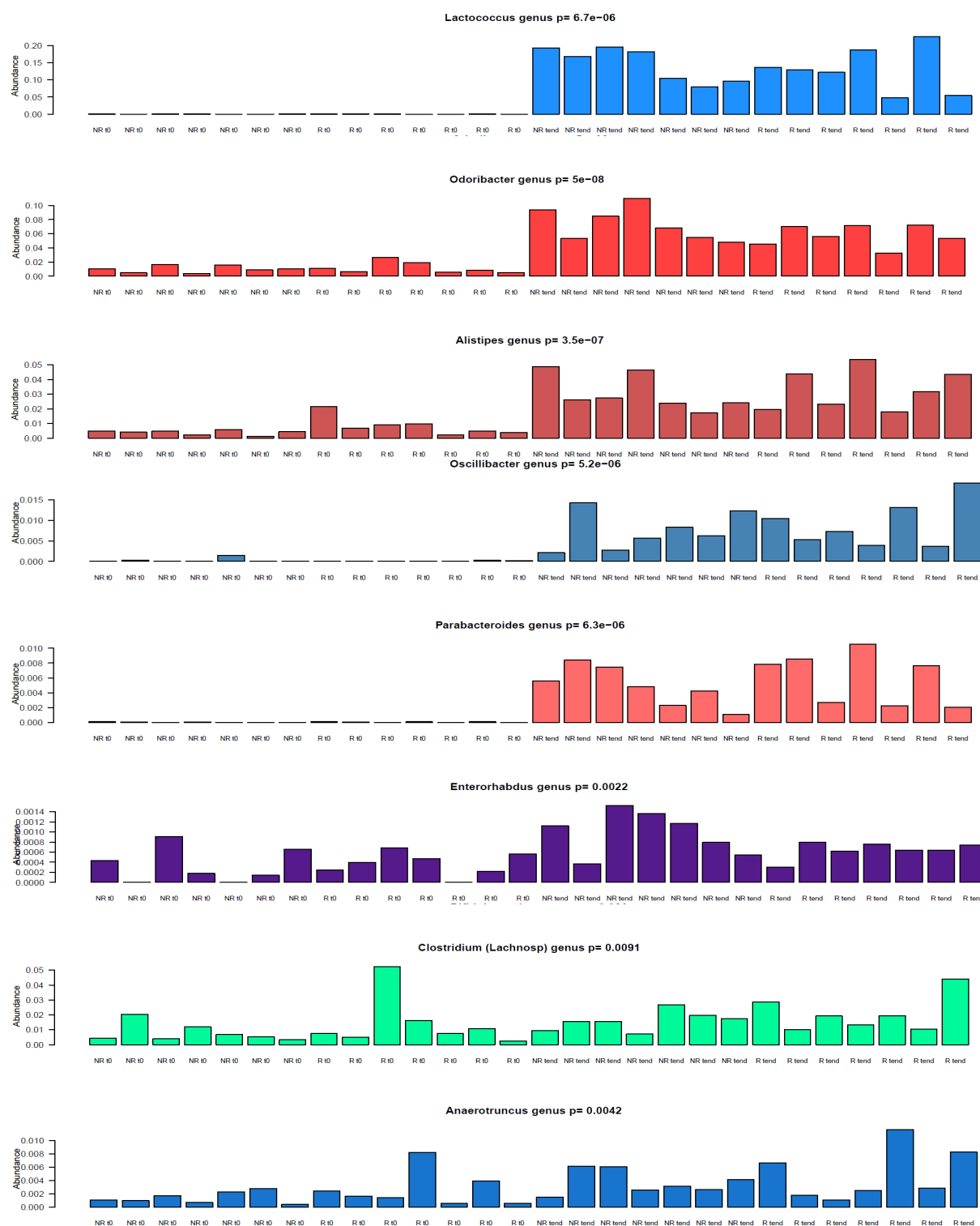
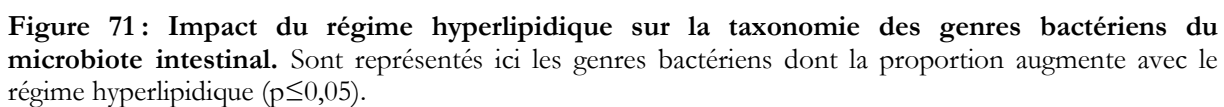


Figure 70 : Analyse taxonomique du microbiote intestinal des 28 échantillons analysés au niveau des phyla et des genres. Le régime hyperlipidique impacte la composition du microbiote intestinal et provoque une tendance à l'homogénéisation de la composition des phyla bactériens et une diversification des genres bactériens. NRt0 : Souris non répondeuse avant régime hyperlipidique, NRtend : Souris non répondeuse après régime hyperlipidique, Rt0 : Souris répondeuse avant régime hyperlipidique, Rtend : Souris répondeuse après régime hyperlipidique.

Les analyses de composition taxonomique portant sur les genres révèlent que la proportion de certains genres augmente après l'administration du régime hyperlipidique ($p \leq 0,05$) (Figure 71): *Lactococcus* (*Firmicutes*), *Odoribacter* (*Bacteroidetes*), *Alistipes* (*Bacteroidetes*), *Oscillibacter* (*Firmicutes*), *Parabacteroides* (*Bacteroidetes*), *Enterorhabdus* (*Actinobacteria*), *Clostridium* (famille des *Lachnospiraceae*) (*Firmicutes*), *Anaerotruncus* (*Firmicutes*), *Escherichia* (*Proteobacteria*), et *Enterococcus* (*Firmicutes*).





Par ailleurs, le régime hyperlipidique impacte la proportion de 5 genres bactériens à la baisse (Figure 72) : *Roseburia* (*Firmicutes*), *Prevotella* (*Bacteroidetes*), *Lactobacillus* (*Firmicutes*), , , *Clostridium* (famille des *Clostridiaceae*) (*Firmicutes*), et *Lachnoclostridium* (*Firmicutes*).

Il semble donc que le régime hyperlipidique impacte principalement le phylum des *Firmicutes* au sein du microbiote intestinal chez les deux groupes de souris.



Figure 72 : Impact du régime hyperlipidique sur la taxonomie des genres bactériens du microbiote intestinal. Sont représenté ici les genres bactériens dont la proportion diminue avec le régime hyperlipidique ($p \leq 0,05$).

L'ensemble des groupes bactériens (aux niveaux des phyla, famille et genres) pour lesquels des différences significatives ($p \leq 0,05$) ont été observées lors de comparaison entre les 4 groupes d'échantillons (NR avant régime, NR après régime, R avant régime, R après régime) sont représentés dans le tableau 13. L'ensemble des différences observées est dû à l'effet du régime.

genus	p	q	status	family	p	q	status	order	p	q	status	phylum	p	q	status
Bifidobacterium (1)	8,92E-02	1,23E-01	t0	Bifidobacteriaceae (1)	8,92E-02	1,30E-01	t0	Bifidobacteriales (1)	8,92E-02	2,23E-01	t0	Actinobacteria (5)	5,35E-01	9,34E-01	t0
Enterorhabdus (3)	2,23E-03	4,92E-03	tend	Coriobacteriaceae (4)	2,06E-01	2,61E-01	tend	Coriobacteriales (4)	2,06E-01	3,44E-01	tend	Actinobacteria (5)	5,35E-01	9,34E-01	t0
Bacteroides (7)	3,52E-01	4,10E-01	tend	Bacteroidaceae (7)	3,52E-01	4,10E-01	tend	Bacteroidales (26)	9,10E-01	9,70E-01	t0	Bacteroidetes (27)	8,04E-01	9,38E-01	t0
Odoribacter (1)	4,99E-08	1,10E-06	tend	Porphyromonadaceae (2)	4,99E-08	9,47E-07	tend	Bacteroidales (26)	9,10E-01	9,70E-01	t0	Bacteroidetes (27)	8,04E-01	9,38E-01	t0
Parabacteroides (1)	6,34E-06	2,00E-05	tend	Porphyromonadaceae	4,99E-08	9,47E-07	tend	Bacteroidales (26)	9,10E-01	9,70E-01	t0	Bacteroidetes (27)	8,04E-01	9,38E-01	t0
Prevotella	7,26E-06	2,00E-05	t0	Prevotellaceae	7,26E-06	2,76E-05	t0	Sacteroideales (26)	9,10E-01	9,70E-01	t0	Bacteroidetes (27)	8,04E-01	9,38E-01	t0
Alistipes (3)	3,49E-07	3,84E-06	tend	Rikenellaceae (3)	3,49E-07	3,32E-06	tend	Bacteroidales (26)	9,10E-01	9,70E-01	t0	Bacteroidetes (27)	8,04E-01	9,38E-01	t0
Mucispirillum (1)	5,56E-02	8,16E-02	tend	Deferribacteraceae (1)	5,56E-02	8,81E-02	tend	Deferribacteriales (1)	5,56E-02	8,85E-01	tend	Deferribacteres (1)	5,56E-02	1,95E-01	tend
Clostridium (Clostrid) (17)	1,86E-05	4,75E-05	t0	Clostridiaceae (17)	1,86E-05	5,89E-05	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Eubacterium (Eub) (7)	6,03E-01	6,57E-01	t0	Eubacteriaceae (7)	6,03E-01	6,74E-01	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Clostridium (Lachnosp) (12)	9,15E-03	1,40E-02	tend	Lachnospiraceae (103)	1,14E-01	1,55E-01	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Dorea (6)	1,64E-01	2,12E-01	t0	Lachnospiraceae	1,14E-01	1,55E-01	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Eubacterium (Lachnosp) (2)	1,80E-01	2,16E-01	tend	Lachnospiraceae	1,14E-01	1,55E-01	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Lachnoclostridium (7)	2,12E-02	3,33E-02	t0	Lachnospiraceae	1,14E-01	1,55E-01	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Roseburia (1)	6,22E-06	2,00E-05	t0	Lachnospiraceae	1,14E-01	1,55E-01	t0	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Oscillibacter (17)	5,23E-06	2,00E-05	tend	Oscillospiraceae (18)	5,23E-06	2,76E-05	tend	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Anaerotruncus (1)	4,16E-03	8,32E-03	tend	Ruminococcaceae (10)	3,40E-05	9,23E-05	tend	Clostridiales (199)	1,78E-01	3,44E-01	t0	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Coprobaillus (1)	8,98E-01	9,53E-01	tend	Erysipelotrichaceae (1)	6,65E-05	1,58E-04	tend	Erysipelotrichales (1)	8,98E-01	9,70E-01	tend	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Enterococcus (1)	6,65E-05	1,63E-04	tend	Enterococcaceae (1)	6,65E-05	1,58E-04	tend	Lactobacillales (4)	3,40E-05	3,40E-04	tend	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Lactobacillus (2)	9,15E-03	1,55E-02	t0	Lactobacillaceae (2)	9,15E-03	1,58E-02	t0	Lactobacillales (4)	3,40E-05	3,40E-04	tend	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Lactococcus (1)	6,75E-06	2,00E-05	tend	Streptococcaceae (1)	6,75E-06	2,76E-05	tend	Lactobacillales (4)	3,40E-05	3,40E-04	tend	Firmicutes (210)	6,67E-01	9,34E-01	t0
Escherichia (1)	6,11E-03	1,12E-02	tend	Enterobacteriaceae (1)	6,11E-03	1,16E-02	tend	Enterobacteriales (1)	6,11E-03	3,05E-02	tend	Proteobacteria (2)	3,76E-06	2,63E-05	tend
Mycoplasma	9,70E-01	9,70E-01	tend	Mycoplasmataceae	9,70E-01	9,70E-01	tend	Mycoplasmatales	9,70E-01	9,70E-01	tend	Tenericutes	9,70E-01	9,70E-01	tend
ND	4,84E-06	2,00E-05	t0	ND1	4,91E-03	1,04E-02	t0	ND2	5,11E-01	7,30E-01	tend	ND3	1,50E-01	3,50E-01	tend

Tableau 13 : Synthèse des analyses statistiques sur les phyla, les ordres, les familles et les genres. Les différences statistiques significatives le sont uniquement par l'effet du régime hyperlipidique et non la distinction NR/R avant le régime hyperlipidique.

Nous identifions par ailleurs, une différence significative de la proportion du phylum des *Proteobacteria* après le régime hyperlipidique (Tableau 13). La proportion des *Proteobacteria* est plus forte après le régime hyperlipidique. L'augmentation de la proportion des *Proteobacteria* est un des effets associé à la prise d'un régime hyperlipidique (Daniel et al. 2014; Hildebrandt et al. 2009).

4.6. Différence entre les échantillons au niveau des méta-espèces

Les gènes différenciellement abondants entre les souris (Tableau 11) ont été projetés sur les clusters de gènes MGS. Il y a 25 méta-espèces (MGS) permettant de distinguer les souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique et 38 méta-espèces (MGS) permettant de distinguer les deux groupes de souris après régime hyperlipidique. Par ailleurs, l'effet du régime révèle 308 MGS modifiés par l'effet du régime chez les souris non répondeuses et 313 MGS modifiés par l'effet du régime chez les souris répondeuses (Tableau 14). Ces résultats confirment que les différences dues au régime sont beaucoup plus importantes que la distinction NR/R.

Néanmoins, et contrairement aux résultats obtenus lors des comparaisons aux niveaux phyla, familles et genres, nous pouvons ici identifier des méta-espèces différentiellement représentées entre répondeurs et non répondeurs et ceci avant et après régime hyperlipidique.

study	paired_a	gp1	gp2	sig_0.05	non_proj	projected	N_mgs_proj	proj_perc
NR_R.t0	FALSE	7	7	16103	12943	3160	25	20
NR.t0_tend	FALSE	7	7	313649	164881	148768	308	47
R.t0_tend	FALSE	7	7	307516	159612	147904	313	48
NR_R.tend	FALSE	7	7	23161	16162	6999	38	30

Tableau 14 : Tableau des MGS contrastés entre les 4 groupes. 1ère colonne : Study : Analyse réalisée. NR_R.t0 : Comparaison entre les deux groupes avant régime hyperlipidique. NR.t0_tend : Comparaison entre les NR avant et après régime hyperlipidique. Rt0_tend : Analyse entre les R avant et après régime hyperlipidique. NR_R.tend : Comparaison entre les deux groupes après régime hyperlipidique.

Une autre analyse statistique prenant en compte l'ensemble des 4 groupes : NR avant régime, R avant régime, NR après régime et R après régime, permet de faire ressortir 4 méta-espèces supplémentaires, soit 29 méta-espèces (CAG) différentiellement représentées entre les répondeuses et les non répondeuses avant l'administration du régime hyperlipidique (Figure 73). Il y a 8 méta-espèces (CAG) plus abondantes chez les souris non répondeuses et 21 méta-espèces (CAG) plus abondantes chez les souris répondeuses avant l'administration du régime hyperlipidique.

Sur les 8 méta-espèces, 5 méta-espèces (CAG) plus abondantes chez les souris non répondeuses ont pu être associées à un genre :

- 3 *Lachnospiraceae*/*Lachnoclostridium* (*Firmicutes*)
- 1 *Lachnospiraceae*/*Dorea* (*Firmicutes*)
- 1 *Clostridiaceae*/*Clostridium* (*Firmicutes*)

Sur les 21 espèces, 10 méta-espèces (CAG) plus abondantes chez les souris répondeuses ont pu être associées à un genre et 2 CAG ont été associées à une espèce :

- 5 *Lachnospiraceae*/*Clostridium* (*Firmicutes*)
- 2 *Clostridiaceae*/*Clostridium*
- 1 *Lachnospiraceae*/*Lachnoclostridium* (*Firmicutes*)
- 1 *Lachnospiraceae*/*Dorea* (*Firmicutes*)
- 1 *Rikenellaceae*/*Alistipes* (*Bacteroides*)
- 1 *Lachnospiraceae* bacterium COE1 (*Firmicutes*)
- 1 *Clostridium* sp. ASF502 (*Firmicutes*)

Ces méta-espèces pourraient servir de marqueurs métagénomiques potentiels prédictifs du développement du phénotype répondeur ou non répondeur avant administration d'un régime hyperlipidique.

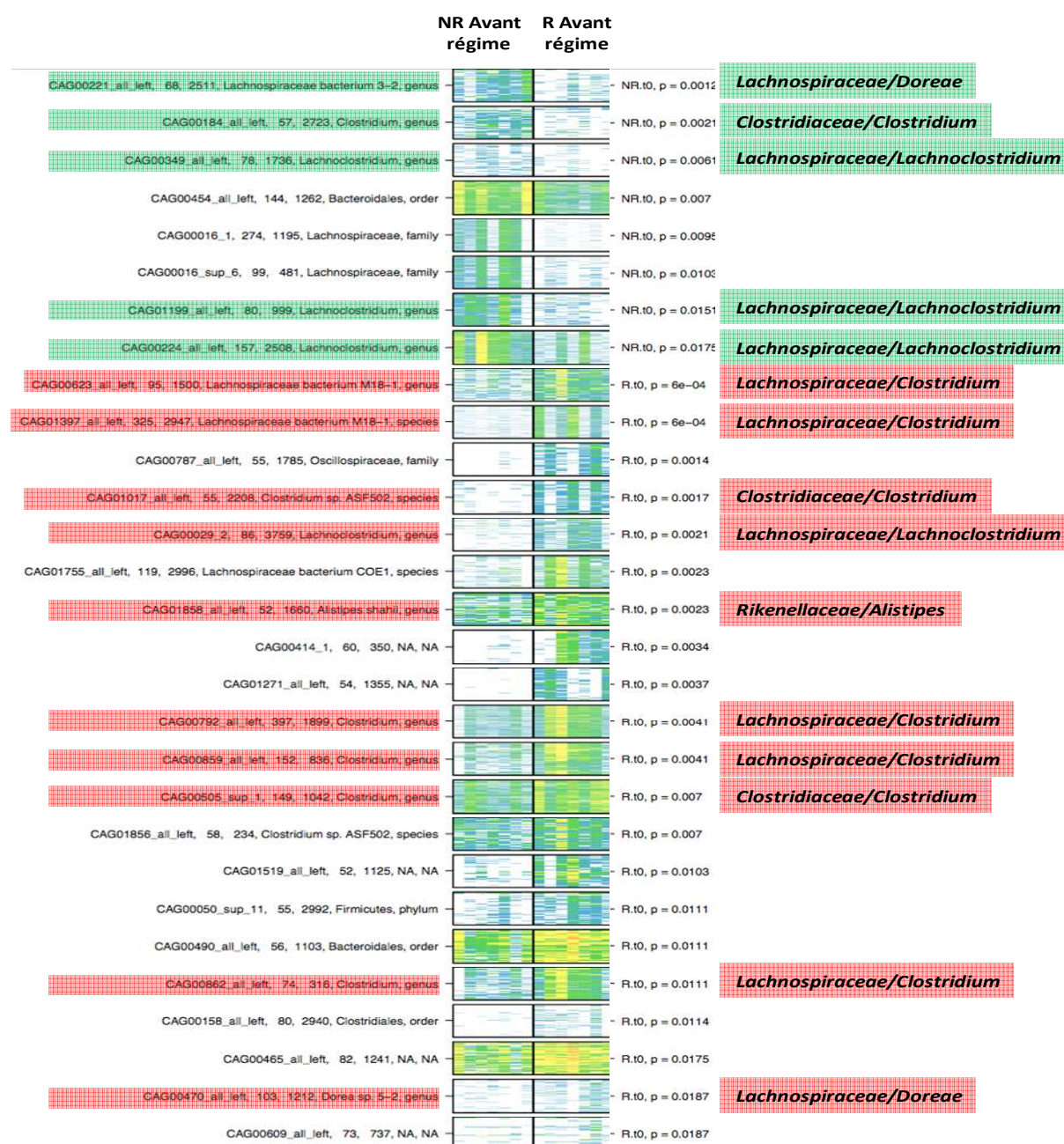


Figure 73 : 29 méta-espèces contrastées entre les souris répondeuses et non répondeuses avant régime hyperlipidique. Le barcode est une heatmap (colorisation) d'un tableau de gènes (en ligne) et n colonnes correspondant aux individus. Une MGS présente chez un individu est donc identifiée par un trait horizontal dont la couleur indique l'abondance. En vert, les genres plus abondants chez les souris NR avant régime. En rouge, les genres plus abondants chez les souris R avant régime

5. Métabolomique

5.1. Métabolome fécal avant régime hyperlipidique

Les 490 variables spectrales identifiées par LC/MS ne permettent pas de distinguer les deux groupes de souris. Une approche par modélisation et analyse discriminante (PLS-DA) permet de distinguer 16 variables spectrales discriminant les deux groupes de souris ($p \leq 0,008$) (Figure 74).

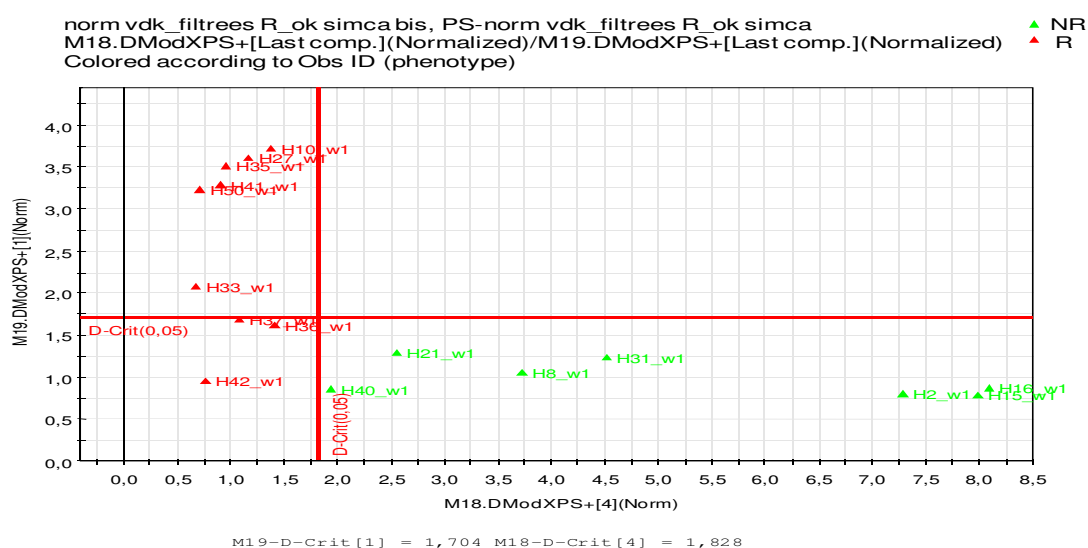


Figure 74 : Analyse discriminante du métabolome fécal. PLS-DA avec les souris répondeuses en rouge et les souris non répondeuses en vert.

Les toutes premières analyses d'identification ont mis en évidence que ces 16 variables spectrales sont associées à des lipides amphiphiles et des acides biliaires, mais l'identification exacte des métabolites fécaux permettant la distinction entre souris répondeuses et non répondeuses n'est pas encore établie à l'heure actuelle.

5.3. Métabolome plasmatique avant régime hyperlipidique

Les analyses discriminantes basées sur la totalité des variables spectrales identifiées par LC/MS (ionisation négative) (1054 variables spectrales) ne permettent pas de distinguer les deux groupes de souris. Cependant, une approche par modélisation et analyse discriminante (PLS) combinée permet de distinguer 18 variables spectrales discriminant les deux groupes de souris ($p \leq 0,0076$) (Figure 76).

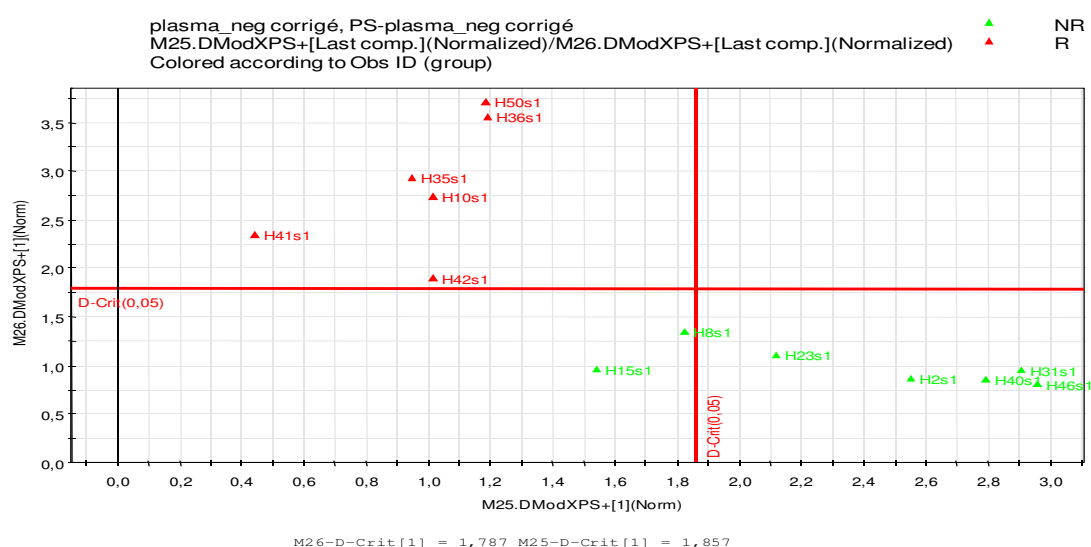


Figure 76 : Analyse discriminante du métabolome plasmatique (ionisation négative). PLS-DA avec les souris répondeuses en rouge et les souris non répondeuses en vert.

Les analyses discriminantes basées sur la totalité des variables spectrales identifiées par LC/MS (ionisation positive) (1767 variables spectrales) ne permettent pas de distinguer les deux groupes de souris. Cependant, une approche par modélisation et analyse discriminante (PLS) combinée permet de distinguer 34 variables spectrales discriminant les deux groupes de souris ($p \leq 0,0041$) (Figure 77).

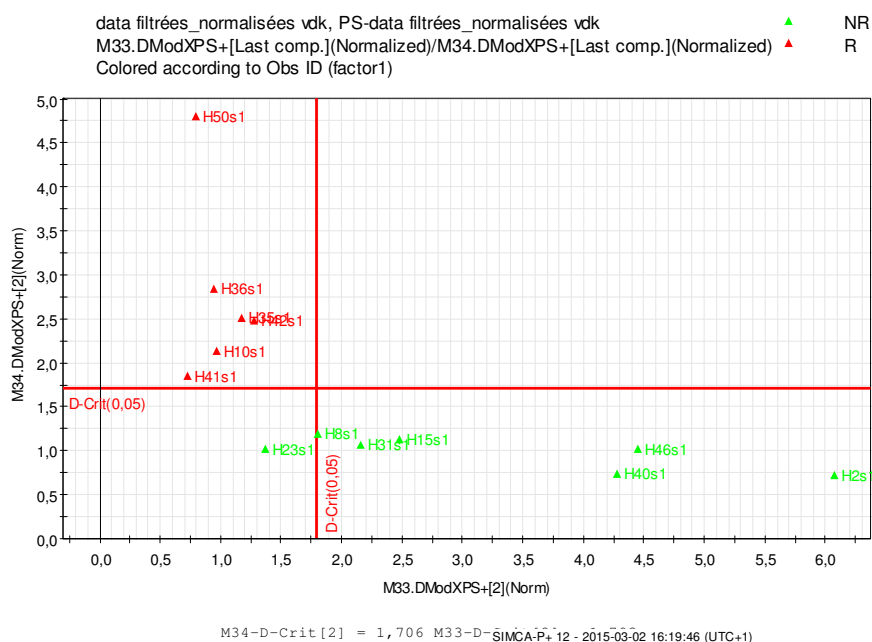


Figure 77 : Analyse discriminante du métabolome plasmatique (ionisation positive). PLS-DA avec les souris répondeuses en rouge et les souris non répondeuses en vert.

Les toutes premières analyses d'identification des 34 et 18 variables spectrales plasmatiques permettant la distinction entre les souris répondeuses et non répondeuses sont associées à des acides aminés et des acides biliaires mais l'identification exacte des métabolites plasmatiques permettant la distinction entre souris répondeuses et non répondeuses n'est pas encore établie à l'heure actuelle.

Un modèle composite associant les variables sélectionnées des 3 matrices précédentes a été calculé. Pour chaque matrice (fèces, urine, plasma mode positif, plasma mode négatif), un modèle statistique (OPLS-DA) a été calculé dans chaque matrice, permettant d'assembler les valeurs des variables de matrice en un score unique : score « fèces », score « urine », score « plasma positif », score « plasma négatif ». Les 4 scores obtenus pour chaque modèle ont été ensuite assemblés dans un super modèle d'analyse discriminante. Ce super modèle calculé avec les scores issus des variables matrices les plus discriminantes permet de distinguer les deux groupes répondeur et non répondeurs avec un haut niveau de significativité ($p=3.6.10^{-10}$) (Figure 78). Après identification des métabolites impliqués, ce super modèle pourrait servir à prédire la résistance ou la susceptibilité au développement de l'obésité.

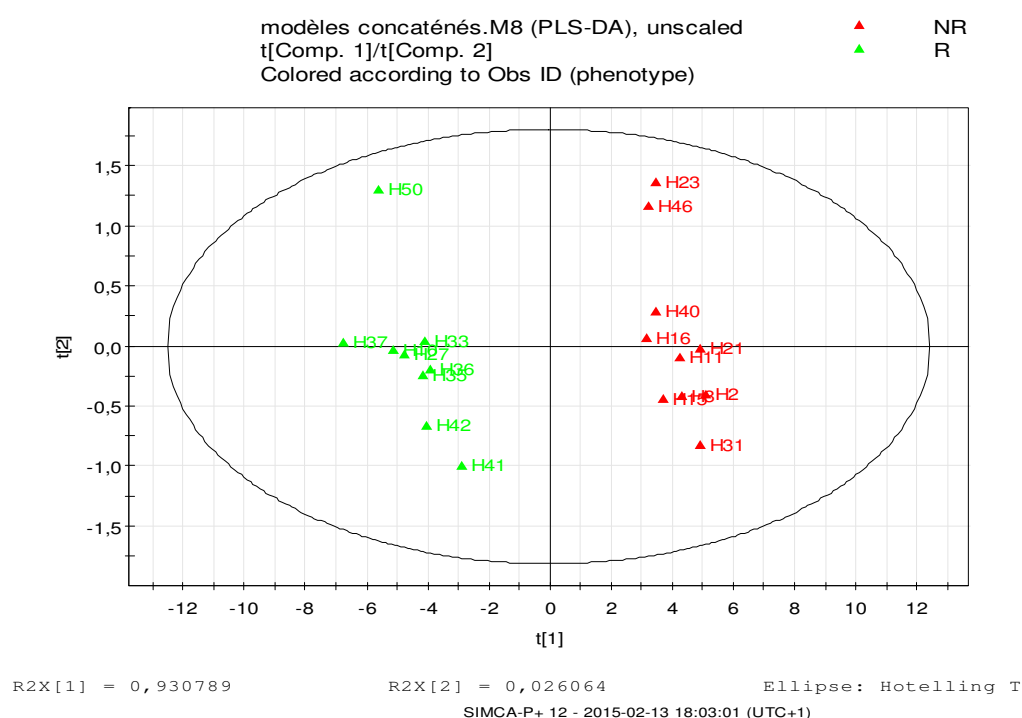


Figure 78 : Super modèle d'analyse discriminante. Les souris répondeuses en rouge et non répondeuses en vert.

De nos jours, l'augmentation de l'incidence de l'obésité est telle, qu'elle a atteint des proportions épidémiques dans les pays industrialisés et constitue un véritable problème de santé publique. L'obésité est associée à un ensemble de désordres métaboliques caractérisés par une altération de l'homéostasie glucidique (intolérance au glucose, résistance à l'insuline, diabète de type 2, ...) et/ou le développement de pathologies ou risques cardiovasculaires (hypertension, dyslipidémie, athérosclérose, dysfonctions endothéliales, ...) (McArdle et al. 2013 ; Mathieu et al. 2010). Le développement de l'obésité est un processus complexe impliquant à la fois des facteurs génétiques et environnementaux. Plusieurs gènes ont été incriminés comme étant responsables du contrôle de l'appétit, de la dépense énergétique et d'autres fonctions métaboliques *in fine* impliquées dans la détermination du poids corporel. Cependant, l'excès d'apport énergétique et la baisse, conjointe, de l'activité physique restent certainement deux facteurs environnementaux clairement associés au développement des désordres métaboliques. Dans les pays industrialisés, les habitudes alimentaires associées à l'obésité révèlent que le maintien d'une balance énergétique positive se fait le plus souvent suite à une consommation excessive de lipides.

Dernièrement, de nouvelles évidences ont permis de supporter l'idée selon laquelle l'augmentation de la prévalence de l'obésité et du diabète de type 2 ne pourrait plus être « simplement » expliquée par des modifications du génome, des habitudes nutritionnelles ou de l'activité physique et le microbiote intestinal a été identifié comme étant un facteur environnemental supplémentaire impliqué dans les processus métaboliques tels que l'homéostasie énergétique (Cani & Delzenne, 2009 ; Vrieze et al., 2010) et associé au développement de l'obésité (Cani et al., 2008 ; Larsen et al., 2010).

Récemment, différentes études ont fait la lumière sur certains aspects clés de la relation mammifère hôte-microbiote intestinal. Les premières études émanent principalement du laboratoire du Professeur Jeffrey I. Gordon de l'Université de Washington. Ces travaux ont révélé que l'obésité est associée à des changements substantiels de la composition et des fonctions métaboliques du microbiote intestinal. En effet, le « microbiote obèse » permet d'augmenter la rentabilité énergétique de notre alimentation et d'en extraire davantage d'énergie (Turnbaugh et al. 2006). Par ailleurs, lors d'une étude précédente, notre équipe a montré que les souris sans germes (dites « axéniques ») sont résistantes à l'obésité et aux désordres métaboliques induits par un régime hypercalorique (Rabot et al. 2010). Notre équipe a également observé que certaines souris conventionnelles soumises à un tel régime développent une obésité et une insulino-résistance importantes (phénotype dit répondeur) tandis que d'autres restent minces et tolérantes au glucose (phénotype dit non répondeur) indépendamment de la quantité de nourriture consommée. Les mécanismes expliquant cette hétérogénéité de phénotype sont actuellement peu connus.

Les objectifs de ce travail de thèse étaient donc i) d'établir les différences physiologiques et métaboliques permettant de distinguer les souris répondeuses des souris non répondeuses, ii) de déterminer s'il existe un microbiote de prédisposition au développement ou à la résistance du développement d'une obésité induite.

Une première étape de ce projet a consisté à définir les stratégies expérimentales adaptées afin de répondre à notre problématique. L'utilisation de souris conventionnelles placées sous régime hyperlipidique est considérée comme un bon modèle d'étude des troubles de l'obésité humaine (Daniel et al. 2013). Nous avons administré un régime hyperlipidique (contenant 60 % de l'énergie amenée par les lipides) à 50 souris de souche C57BL/6J. Cette souche de souris est connue comme étant une souche dite « susceptible » au développement de l'obésité lors de l'administration d'un régime hyperlipidique (Montgomery et al. 2013) contrairement à d'autres souches plus résistantes. Nous avons alors sélectionné les souris répondeuses (R) et non répondeuses (NR) en basant notre sélection sur un nombre restreint de paramètres directement associés au développement de l'obésité : le gain de poids, le poids de la masse grasse et du foie, l'efficacité alimentaire et l'intolérance au glucose. La prise de poids et l'obésité qui découlent de la consommation d'un régime hyperlipidique sont en effet les effets les plus facilement remarquables. Par ailleurs, la plus grande efficacité alimentaire des souris obèses est connue depuis quelques années (Turnbaugh et al. 2006 ; Cani et al. 2009). L'intolérance au glucose est généralement associée au développement de l'obésité induite par un régime hyperlipidique (de Wit et al. 2008), mais chose intéressante ici, nous avons constaté que le développement de l'obésité et de l'intolérance au glucose sont en partie indépendants. Les individus répondeurs ayant l'obésité la plus marquée ne sont pas forcément les individus les plus intolérants au glucose et réciproquement.

Une fois cette sélection effectuée nous nous sommes alors intéressés à connaître ce qui permettait de distinguer les souris répondeuses (R) des souris non répondeuses (NR).

1. Distinction des NR et des R

Nous avons constaté que les souris répondeuses ont une glycémie à jeun, et des taux d'insuline et de résistine plus importants que les souris non répondeuses. Ces résultats se retrouvent dans la différence de l'indice HOMA que l'on retrouve entre les deux groupes : les souris répondeuses ayant un indice plus élevé que les souris non répondeuses. L'insulinorésistance est une des comorbidités associées au développement de l'obésité (Romeo et al. 2012) et précèdent généralement le développement d'un diabète de type 2. De part son rôle central dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Samuel et al. 2012), le niveau d'insulinorésistance des souris pourrait donc servir d'indicateur du développement du phénotype répondeur ou non-répondeur. Il faudrait valider cette hypothèse en réalisant des clamps euglycémique hyperinsulinémique qui permettrait de connaître le niveau exacte de l'insulinorésistance de chaque groupe.

Autre fait intéressant, les souris répondeuses ont une consommation alimentaire totale plus élevée que les souris non répondeuses. On pourrait donc penser que c'est uniquement parce qu'elles mangent plus que les souris répondeuses grossissent plus et développent une obésité plus marquée que les souris non répondeuses. Mais cette consommation alimentaire totale est à mettre en parallèle avec l'efficacité alimentaire des souris et les concentrations de leptine plasmatique. L'efficacité alimentaire correspond au gain de poids total de la souris divisé par sa consommation alimentaire. Cette efficacité alimentaire est nettement plus élevée chez les souris répondeuses que

chez les souris non répondeuses. Ainsi, pour une même quantité de nourriture consommée, les souris répondeuses prennent plus de poids que les souris non répondeuses. Par ailleurs, les souris répondeuses ont une concentration plasmatique de leptine plus importante que les souris non répondeuses. La leptine est une hormone anorexigène produit par le tissu adipeux blanc qui, en temps normal, régule notamment la dépense énergétique dans l'organisme en favorisant la lipolyse et en inhibant la lipogenèse d'une part (Moran & Philipp 2003) et en augmentant la sensibilité à l'insuline et le captage du glucose d'autre part (Yadav et al. 2013). Le taux de leptine plus élevé chez les souris répondeuses est en accord avec ce qui est régulièrement démontré chez les personnes obèses (Sáinz et al. 2015). De plus, chez l'homme, le développement de l'obésité s'accompagne d'une leptinorésistance au niveau du système nerveux central. Ainsi, les individus obèses sont dérégulés au niveau de leurs sensations de satiété et malgré une sécrétion de leptine plus importante, ont une consommation alimentaire plus élevée que la moyenne. On peut donc supposer que, dans notre étude, les souris répondeuses aient un état de leptinorésistance, ce qui les amène à avoir une consommation alimentaire plus élevée que les souris non répondeuses malgré une sécrétion de leptine plus importante.

Le dosage des AGCC caeaux n'a pas révélé de différences entre les souris répondeuses et non répondeuses que ce soit en quantité totale ou en concentration. Chez l'homme, la concentration d'AGCC chez le sujet obèse est plus faible que chez le sujet mince bien qu'une étude ait montré une concentration de propionate plus élevée chez les individus obèses ou en surpoids, tandis que les concentrations de butyrate, de valérate et d'acétate sont inchangées comparativement aux individus minces (Schwiertz et al. 2010). Jakobsdottir et coll. ont observé qu'un régime hyperlipidique induisait une diminution de la formation d'AGCC caeaux chez le rat mais favorise une augmentation de la production de cholestérol ainsi qu'une inflammation et une stéatose hépatique tandis qu'un régime riche en fibre neutralise ces effets (Jakobsdottir et al. 2013). Dans notre étude, les souris répondeuses ont une concentration plasmatique plus élevée de cholestérol total que les souris non répondeuses. Par ailleurs, les AGCC régulent la balance entre la synthèse et l'oxydation des acides gras. En temps normal, l'oxydation des acides gras est activée par les AGCC tandis que la lipogenèse *de novo* et la lipolyse sont inhibées. L'absence de différence de quantité ou de concentration d'AGCC entre les souris répondeuses et non répondeuses observée ici ne permet pas d'impliquer la production d'AGCC dans la dérégulation de la balance de l'homéostasie énergétique chez les souris répondeuses.

Les souris répondeuses ont un gain de poids associé à une masse grasse plus grande que les souris non répondeuses. Le développement du tissu adipeux est une des caractéristiques fondamentales associée à un état d'obésité (Sun et al. 2011) et la taille des adipocytes du tissu adipeux inguinal des souris répondeuses est plus importante que celles des souris non répondeuses. Cependant, malgré cette distinction morphologique et une capacité de stockage des lipides différente entre les deux groupes de souris, nous avons constaté peu d'effet du régime hyperlipidique sur l'expression des gènes analysés dans le tissu adipeux inguinal. Ainsi, seul la Fatty Acid Synthase (FAS), enzyme de biosynthèse des acides gras (lipogenèse *de novo*) est plus fortement exprimée dans le tissu adipeux inguinal des souris répondeuses que dans celui des souris non répondeuses. Cette augmentation de l'expression de FAS est en accord avec ce qui a déjà été démontré chez l'homme (sur des cultures cellulaires de tissu adipeux) où la plus forte expression de FAS est associée à une accumulation de lipides dans le tissu adipeux (Berndt et al. 2007). Le niveau d'expression de FAS est dépendant de la concentration d'insuline circulante et

de l'état d'insulinorésistance de l'individu (Menendez et al. 2009). Ainsi, l'état d'insulinorésistance des souris répondeuses pourrait être responsable de cette surexpression de FAS, ce implique que les souris répondeuses aient une régulation de la balance oxydation/synthèse des lipides perturbée en faveur de la synthèse et du stockage des lipides au niveau de leur tissu adipeux.

Le foie des souris répondeuses montre les signes d'une stéatose hépatique importante (signe d'un stockage lipidique plus important) tandis que le foie des souris non répondeuses ne montre que de très faibles inclusions lipidiques. Chez l'homme la stéatose touche plus de 80% des obèses (Angulo 2002) et est généralement asymptomatique. La stéatose hépatique est un des signes cliniques de NAFLD (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease), qui regroupe un ensemble de maladies dites « maladies du foie non alcoolique » (Brunt 2010). Les NAFLD vont de la stéatose à la stéatohépatite (Non-Alcoholic SteatoHepatitis, NASH), la fibrose, la cirrhose et parfois le carcinome hépatocellulaire. Les NAFLD sont fréquemment associées à l'obésité viscérale et l'insulinorésistance (Brunt 2010). L'analyse de l'expression des gènes du foie a révélé que les gènes codants pour l'enzyme FAS et le transporteur de lipides CD36 étaient surexprimés chez les souris répondeuses comparativement aux souris non répondeuses. CD36 est un récepteur membranaire liant les acides gras et permettant leur absorption par la cellule. Chez l'homme comme chez la souris, l'augmentation du niveau d'expression de CD36 dans le foie est corrélée à une augmentation du contenu en triglycérides (Miquilena-Colina et al. 2011). L'expression de FAS est insulinodépendante (Jensen-Urstad & Semenkovich 2012) et l'état d'insulinorésistance des souris répondeuses est peut-être responsable de cette surexpression hépatique de FAS. L'ensemble de ces résultats indique que l'état d'insulinorésistance des souris répondeuses semble provoquer une dérégulation de la balance oxydation/lipogenèse hépatique au profit de la lipogenèse *de novo*, de l'absorption et du stockage de triglycérides intra hépatique et que la stéatose hépatique, associée à un état d'insulinorésistance, pourrait donc être un indicateur du développement du phénotype répondeur chez la souris. Par ailleurs, nous avons observé une structuration distincte des souris répondeuses et non répondeuses en ACP, signe que l'ensemble des gènes analysés dans le foie pourraient tout de même servir de marqueurs au développement du phénotype répondeur ou non répondeur.

Le régime hyperlipidique impacte la structure de l'épithélium intestinal des souris répondeuses. Les coupes histologiques ont révélé que les villosités de l'iléon des souris répondeuses sont plus grosses et moins bien organisées que celles des souris non répondeuses tandis que la sous-muqueuse des souris non répondeuses est plus épaisse que celles des souris répondeuses ce qui pourrait être interprété comme le signe d'une augmentation de la perméabilité intestinale. Cependant, les analyses d'expressions de gènes de l'iléon n'ont pas montré de différence d'expression de CLDN2 entre répondeurs et non répondeurs, une des principale composantes de la mise en place et du maintien des jonctions serrées des tissus épithéliaux (Günzel 2012). Les souris répondeuses ont une plus forte expression du transporteur de lipides intracellulaire FABP2 comparativement aux souris non répondeuses. Ceci traduit certainement une adaptation différente des fonctions intestinales des souris répondeuses au régime hyperlipidique, et notamment une plus forte capacité d'assimilation des lipides en excès apportés par l'alimentation (de Wit et al. 2011).

Deux gènes codant des protéines de la chaîne respiratoire (NDUFA11 et UCP3) ainsi que le facteur de transcription PPAR α et l'enzyme PDK4 sont plus faiblement exprimés dans le

muscle squelettique des souris répondeuses comparativement aux souris non répondeuses. Ces deux premiers gènes codent pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative mitochondriale (Mimaki et al. 2012 ; Jia et al. 2009) tandis que PPAR α est un facteur de transcription nucléaire impliqué dans l'oxydation des lipides (Evans et al. 2004) et PDK4 une enzyme impliquée dans la conversion du pyruvate (issu de la glycolyse) en acétyl-coA. Le régime hyperlipidique favorise une diminution de l'expression de nombreux gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative mitochondriale (Sparks et al. 2005) du muscle squelettique. D'autre part, la régulation de l'expression de PDK4 est insulino-dépendante et peut-être que l'état d'insulinorésistance des souris répondeuses pourrait donc aboutir à une dérégulation de l'expression de PDK4 dans le muscle squelettique. Ces résultats laissent à penser que les souris non répondeuses pourraient avoir une meilleure capacité d'oxydation des lipides ainsi qu'une plus forte activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et une meilleure dissipation de l'énergie que les souris répondeuses. Les souris non répondeuses utiliseraient ainsi plus d'énergie au niveau musculaire et dissiperait plus facilement cette énergie sous forme de chaleur tandis que les souris répondeuses stockeraient l'excédent énergétique au niveau de leur tissu adipeux et dans le foie (sous forme de triglycérides notamment) et auraient une dérégulation de l'homéostasie énergétique via un déséquilibre globale oxydation/lipogenèse qui pourrait être associé à leur état d'insulinorésistance (plus élevée que chez les souris non répondeuses).

L'obésité est associée à un état inflammatoire permanent, caractérisée par une production anormale d'adipokines, une infiltration macrophagiques dans le tissu adipeux et l'activation de voies de signalisation pro-inflammatoires, se traduisant par une induction de marqueurs plasmatiques de l'inflammation et une inflammation à bas bruit systémique (McArdle et al. 2013). Pour chacun des tissus analysés nous n'avons pas observé de distinction dans l'expression des gènes codant des protéines impliquées dans l'inflammation entre les souris répondeuses et non répondeuses. Ainsi l'expression hépatique des cytokines IL6, IL1B ou de TNF α est identique entre les deux groupes. De même, l'expression dans l'iléon de TLR4 et TLR5 est identique entre les deux groupes. Enfin l'expression de TNF α , de TLR4 et d'IL6 dans le tissu adipeux inguinal ne révèle pas de différence entre les deux groupes. Cependant, et bien que nous n'ayons pas observé de différence dans l'expression de MCP1 dans le tissu adipeux inguinal entre les souris répondeuses et non répondeuses, les dosages plasmatiques de MCP1 révèlent une plus forte concentration chez les souris répondeuses comparativement aux souris non répondeuses. Mais ce résultat n'est pas suffisant pour constater une différence de niveau d'inflammation systémique entre les deux groupes, d'autant que le dosage plasmatique d'IL6, bien qu'étant plus élevé chez les souris high fat comparativement aux souris contrôles n'est pas différent entre les souris répondeuses et non répondeuses.

Des travaux ont montré que le microbiote intestinal pouvait initier l'état inflammatoire associé à l'obésité et à l'insulinorésistance par l'intermédiaire des lipopolysaccharides (LPS) (Cani et al. 2008). En effet, la reconnaissance des LPS par le complexe CD14-TLR-4 (CD14) présent à la surface de cellules immunitaires peut déclencher des processus inflammatoires. Dans cette étude nous n'avons pas observé de différence statistiquement significative de concentrations de LPS plasmatique entre les souris répondeuses et non répondeuses. Nous ne pouvons donc pas conclure quant à une réelle endotoxémie métabolique chez les souris répondeuses.

Au vue de l'ensemble de ces résultats, le développement du phénotype répondeur semble reposer sur un gain de poids associé à une efficacité alimentaire plus forte ainsi qu'un état d'insulinorésistance et de leptinorésistance. Le développement du phénotype répondeur s'accompagne d'une plus forte capacité d'absorption des lipides au niveau du tissu adipeux mais aussi du foie et de l'iléon. D'autre part, l'activité de la lipogenèse *de novo* est plus prononcée dans le foie et le tissu adipeux, ce qui participe à l'accumulation de lipides dans ces organes, tandis que les capacités d'oxydation des lipides semblent plus fortement réprimées. Enfin, l'activité de phosphorylation oxydative plus faible dans le muscle squelettique traduit une moins bonne dépense énergétique des souris répondeuses, ce qui concourt également à une plus forte capacité du stockage de l'énergie chez ces souris.

2. Microbiote de prédiction

Plusieurs articles originaux ont été publiés au cours des dernières années, qui relatent la comparaison de la composition du microbiote intestinal chez des patients obèses *versus* minces, ou chez des patients obèses et/ou diabétiques. Ce sont principalement des analyses corrélatives qui ont suggéré que certains phyla, genre, ou espèces bactériennes étaient positivement, ou négativement corrélés à l'excès de masse grasse, ou à un comportement alimentaire inadéquat. Ainsi, les premières données, aujourd'hui controversées, suggéraient un changement du rapport entre les deux phyla bactériens les plus importants, c'est-à-dire une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* associées au gain de poids (Ley et al. 2005, Ley et al. 2006). Plus récemment, une réduction de la diversité bactérienne du microbiote intestinal est également rapportée par plusieurs études (Le Chatelier et al. 2013 ; Turnbaugh et al. 2009).

Dans ce projet de thèse, notre but a été d'identifier s'il existe un microbiote de prédisposition au développement (ou à la résistance) de l'obésité. Pour ce faire nous avons utilisé l'approche de métagénomique afin d'identifier les profils du microbiote intestinal des souris avant l'administration d'un régime hyperlipidique d'une part, et, d'autre part, l'approche métabolomique afin d'identifier des biomarqueurs (métabolites) potentiels de prédisposition au développement ou à la résistance de l'obésité.

Les analyses de métagénomique laissent apparaître un effet prédominant du régime hyperlipidique sur la distinction des phénotypes répondeurs/non répondeurs. En effet, lors de la comparaison du nombre de gènes entre les différents groupes, nous avons observé une augmentation du nombre de gènes pour les deux groupes de souris entre le début et la fin du régime mais pas de différence entre les deux groupes avant (et après) administration du régime. D'autre part, nous avons constaté que le nombre de gènes différenciellement abondant entre les répondeurs et les non répondeurs avant administration du régime hyperlipidique est tout à fait minoritaire comparé aux nombre de gènes différenciellement abondants au sein de chaque groupe avant et après régime. Par ailleurs, le regroupement hiérarchique basé sur les gènes d'une part et sur les méta-espèces d'autre part, ne permet pas de distinguer le groupe répondeur et non répondeur avant l'administration du régime hyperlipidique. Il apparaît donc que, dans notre étude, le régime hyperlipidique favorise une augmentation du nombre de gènes et de méta-espèces au sein des groupes de souris répondeuses et non répondeuses, ce qui laisse à penser qu'il

existe donc un enrichissement de la communauté microbienne après administration du régime hyperlipidique. Le régime hyperlipidique est connu comme favorisant un remaniement de la composition du microbiote intestinal et donc impactant sa diversité (Daniel et al. 2014). Daniel et coll. ont ainsi montré que des souris ayant reçu un régime hyperlipidique ont une plus faible proportion de bactéries appartenant à la famille des *Ruminococcaceae* (*Firmicutes*) et une plus forte proportion de *Rikenellaceae* (*Bacétroïdètes*) comparativement à des souris ayant reçu un régime contrôle. Les souris ayant reçu un régime hyperlipidique ont également une augmentation du nombre de bactéries appartenant au genre *Alistipes* (de la famille des *Rikenellaceae*) (Daniel et al. 2014). D'autre part Hildebrandt et coll. ont montré qu'un régime hyperlipidique pouvait favoriser l'augmentation du nombre de gènes au sein du microbiote intestinal murin (Hildebrandt et al. 2009).

Les analyses des méta-espèces du microbiote des souris permettent de faire ressortir 29 méta-espèces différenciellement représentées avant l'administration du régime hyperlipidique. Sur ces 29 méta-espèces, une majorité d'entre elles ont pu être associée à un genre. Nous avons ainsi constaté que la grande majorité des genres en présence appartenait au phylum des *Firmicutes*. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la majorité des espèces présente au sein du microbiote appartiennent au phylum des *Firmicutes*. Avant administration du régime hyperlipidique, 8 méta-espèces, dont 5 ont pu être associées à un genre, sont plus abondantes chez les souris non répondeuses ; et 21 méta-espèces, dont 10 ont pu être associées à un genre, sont plus abondantes chez les souris répondeuses. Il y a donc une majorité des méta-espèces qui est plus abondante chez les souris répondeuses avant le régime hyperlipidique.

Chez les souris non répondeuses, 4 des méta-espèces identifiées appartiennent à la famille des *Lachnospiraceae* (dont trois au genre *Lachnoclostridium* et une au genre *Dorea*) et une méta-espèce appartient à la famille des *Clostridiaceae* (genre *Clostridium*). Chez les souris répondeuses, 8 méta-espèces appartiennent à la famille des *Lachnospiraceae* dont 5 au genre *Clostridium*, une au genre *Lachnoclostridium*, une au genre *Dorea* et une espèce *Lachnoclostridium bacterium* ; et trois méta-espèces appartiennent à la famille *Clostridiaceae* et au genre *Clostridium*. Dans chacun des groupes les méta-espèces appartiennent donc majoritairement à la famille des *Lachnospiraceae* (classe des *Clostridia*). Une approche par métatranscriptomique des transcrits de l'ARN 16S a démontré que les bactéries de la famille des *Lachnospiraceae* font parti des bactéries les plus actives au sein du microbiote avec les *Ruminococcaceae*, *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, et les *Rikenellaceae* (Gosalbes et al. 2011). Un régime hyperlipidique induit une augmentation du nombre de bactéries appartenant à cette famille (Ravussin et al. 2012). Cependant, quelques espèces de cette famille sont impliquées dans la production de butyrate (Louis et al. 2010), le butyrate ayant un effet protecteur contre le développement de l'obésité, l'insulinorésistance et intervient également dans la modulation de la barrière intestinal (Gao et al. 2009). Il est donc possible que les espèces appartenant à la famille des *Lachnospiraceae* productrices de butyrate soient plus représentées au sein du microbiote des souris non répondeuses avant le régime hyperlipidique, bien que nous ne puissions pas le confirmer ici (nous n'avons pas l'identification précises des espèces).

Les analyses métabolomiques ont permis de construire des modèles discriminants les souris répondeuses et non répondeuses avant administration du régime hyperlipidique pour chacun des fluides analysés (plasmatique, fécal et urinaire). Nous avons ainsi deux modèles discriminants permettant de distinguer les deux groupes de souris au niveau de leurs métabolomes plasmatique : un modèle contenant 18 variables spectrales (ionisation négative) et un modèle contenant 34 variables spectrales (ionisation positive) discriminantes entre les souris répondeuses et non répondeuses. Les analyses par ionisation négative et positive permettent d'obtenir un plus grand nombre de variables spectrales, certaines molécules s'ionisant plus facilement dans un mode que dans un autre. Les analyses discriminantes du métabolome urinaire permettent d'obtenir un modèle basé sur 46 variables spectrales permettant de distinguer les souris répondeuses des souris non répondeuses. Enfin, les analyses discriminantes du métabolome fécal permettent d'obtenir un modèle basé sur 16 variables spectrales distinguant les deux groupes de souris.

Un des intérêts d'utiliser la métabolomique dans un contexte d'obésité est que les profils de métabolites obtenus peuvent démontrer des patrons pouvant potentiellement suggérer des signes précurseurs de certaines pathologies associées à l'obésité, même avant l'apparition de symptômes liés à la maladie. De plus, des études récentes ont évalué les profils métabolomique en lien avec la distribution des graisses, afin d'identifier de possibles biomarqueurs de l'obésité viscérale, qui est particulièrement associée aux complications métaboliques (Tchernof et al. 2013). L'approche par métabolomique a ainsi permis de montrer que le profil des acides aminés ramifiés était altéré chez les personnes obèses (Morris et al. 2012). Cheng et coll ont par ailleurs identifié la glutamine, le glutamate et le ratio glutamine/glutamate comme étant associés avec le risque de développer un diabète de type 2 (Cheng et al. 2012). Une analyse par métabolomique ciblée a également permis de mettre en évidence 12 métabolites significativement associés à l'obésité dont la glycine, la glutamine, la glycéro-phosphatidylcholine qui sont en concentrations plus élevées dans le plasma des individus obèses comparativement à des individus minces (Oberbach et al. 2011). Une autre étude a identifié 3 lyso-phosphatidylcholine comme biomarqueurs plasmatique potentiels de l'obésité (Barber et al. 2012). Une étude effectuée sur le métabolome urinaire d'individus obèses a permis d'identifier des métabolites dérivés du microbiote intestinal permettant de distinguer ces individus obèses des individus minces. Ainsi, la trigonelline (alcaloïde), le 2-hydroxyisobutyrate (dérivé d'acides gras), l'acide hippurique (dérivé d'acides aminés) et la xanthine (dérivé des bases puriques) sont les métabolites identifiés discriminant les individus minces des individus obèses (Calvani et al. 2010).

L'identification des métabolites impliqués dans chacun des modèles construits lors de cette étude est en cours permettra de préciser la nature des métabolites impliqués et d'en dégager très certainement des biomarqueurs de prédisposition au développement de l'obésité induite. Par définition, les métabolites analysés par métabolomique peuvent en effet être considérés comme des biomarqueurs, c'est à dire des indicateurs des processus biologiques normaux et pathologiques mesurés objectivement et qui ont pour but de prédire un bénéfice ou un dommage, ceci basé sur des données épidémiologiques ou pathophysiologiques (Atkinson et al. 2001). La découverte de nouveaux biomarqueurs est d'intérêt en raison de leurs nombreuses applications potentielles et leur impact majeur sur l'industrie pharmaceutique et les services de santé courants. Il est suggéré que l'implantation de biomarqueurs au niveau du développement des médicaments pourrait réduire le temps et les coûts engendrés. De plus, le diagnostic

moléculaire des pathologies pourrait améliorer la compliance des patients et réduire les coûts résultants des faux-positifs et de la détection tardive (Morris et al. 2005).

3. Perspectives

L'identification des 29 méta-espèces différentiellement représentées au sein des microbiotes des souris répondeuses et non répondeuses associée aux métabolites (prochainement identifiés) discriminants dans chacune des matrices biologiques est une perspective de recherche intéressante. Nous pouvons par exemple envisager d'utiliser ces méta-espèces et les métabolites prochainement identifiés afin de « prédire » le développement du phénotype répondeur ou non répondeur d'une obésité induite. Ainsi, en prenant un lot de souris C57/BL6, nous pouvons soumettre ces souris à 15 jours de régime contrôle avant de leur administrer un régime hyperlipidique. En séquençant leurs métagénomes et en analysant leur métabolome avant l'administration du régime hyperlipidique, nous pourrions observer si nous identifions les mêmes méta-espèces et les mêmes métabolites biomarqueurs de prédisposition au développement de l'obésité induite. Mais surtout, il sera particulièrement intéressant de regarder si l'ensemble de ces méta-espèces ainsi que les biomarqueurs prochainement identifiés peuvent également se retrouver chez l'homme, ce qui permettrait de valider une combinaison d'espèces bactériennes et de métabolites comme biomarqueurs de prédisposition ou de résistance au développement de l'obésité.

- Agans, R. et al., 2011. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS microbiology ecology*, 77(2), pp.404–412.
- Ajslev, T.A. et al., 2011. Childhood overweight after establishment of the gut microbiota: the role of delivery mode, pre-pregnancy weight and early administration of antibiotics. *International journal of obesity*, 35(4), pp.522–529.
- Alexander, J. et al., 2006. Distinct phenotypes of obesity-prone AKR/J, DBA2J and C57BL/6J mice compared to control strains. *International journal of obesity*, 30(1), pp.50–59.
- Alhouayek, M. et al., 2011. Increasing endogenous 2-arachidonoylglycerol levels counteracts colitis and related systemic inflammation. *The FASEB Journal*, 25(8), pp.2711–2721.
- Alhouayek, M. & Muccioli, G.G., 2012. The endocannabinoid system in inflammatory bowel diseases: from pathophysiology to therapeutic opportunity. *Trends in molecular medicine*, 18(10), pp.615–625.
- Amann, R.I. et al., 1990. oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations . Combination of 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes with Flow Cytometry for Analyzing Mixed Microbial Populations. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), pp.1919–25.
- Amann, R.I., Ludwig, W. & Schleifer, K.H., 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, 59(1), pp.143–169.
- Amar, J. et al., 2008. Energy intake is associated with endotoxemia in apparently healthy men. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), pp.1219–1223.
- Anandacoomarasamy, A. et al., 2007. The impact of obesity on the musculoskeletal system. *Int J Obes*, 32(2), pp.211–222.
- Anderson, P.D. et al., 2007. Innate immunity modulates adipokines in humans. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(6), pp.2272–2279.
- Andoh, A. et al., 2012. Multicenter analysis of fecal microbiota profiles in Japanese patients with Crohn's disease. *Journal of gastroenterology*, 47(12), pp.1298–1307.
- Andrikopoulos, S. et al., 2005. Differential effect of inbred mouse strain (C57BL/6, DBA/2, 129T2) on insulin secretory function in response to a high fat diet. *Journal of endocrinology*, 187(1), pp.45–53.
- Angulo, P. (2002). Nonalcoholic fatty liver disease. *New England Journal of Medicine*, 346(16), pp.1221–1231
- Anini, Y. & Brubaker, P.L., 2003. Role of leptin in the regulation of glucagon-like peptide-1 secretion. *Diabetes*, 52(2), pp.252–259.

- Arora, T., Sharma, R. & Frost, G., 2011. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? *Appetite*, 56(2), pp.511–515.
- Arumugam, M. et al., 2011. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346), pp.174–80.
- Atkinson, A. J., et al. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework*. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 69(3), pp.89-95.
- Azzout-Marniche, D. et al., 2000. Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes. *Biochem. J.*, 350, pp.389–393.
- Bäckhed, F. et al., 2007. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(3), pp.979–84.
- Bäckhed, F. et al., 2004. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(44), pp.15718–23.
- Balch, W.E. et al., 1979. Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiological reviews*, 43(2), p.260.
- Banerjee, R.R. et al., 2004. Regulation of fasted blood glucose by resistin. *Science*, 303(5661), pp.1195–1198.
- Bargut, T.L. et al., 2014. Effects of a Diet Rich in n-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Hepatic Lipogenesis and Beta-Oxidation in Mice. *Lipids*, 49(5), pp.431–444.
- Barber, M. N., et al. (2012). Plasma lysophosphatidylcholine levels are reduced in obesity and type 2 diabetes. *PLoS One*, 7(7), e41456.
- Barnea, M. et al., 2006. A High-Fat Diet Has a Tissue-Specific Effect on Adiponectin and Related Enzyme Expression. *Obesity*, 14(12), pp.2145–2153.
- Bastard, J.P. et al., 2000. Elevated levels of interleukin 6 are reduced in serum and subcutaneous adipose tissue of obese women after weight loss. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(9), pp.3338–42.
- Baumgart, M. et al., 2007. Culture independent analysis of ileal mucosa reveals a selective increase in invasive *Escherichia coli* of novel phylogeny relative to depletion of Clostridiales in Crohn's disease involving the ileum. *ISME J.*, 1(5), pp.403–418.
- Ben-Amor, K. et al., 2005. Genetic Diversity of Viable, Injured, and Dead Fecal Bacteria Assessed by Fluorescence-Activated Cell Sorting and 16S rRNA Gene Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(8), pp.4679–4689.

- Benndorf, D. et al., 2007. Functional metaproteome analysis of protein extracts from contaminated soil and groundwater. *The ISME Journal*, 1(3), pp.224–234.
- Berndt, J. et al., 2007. Fatty acid synthase gene expression in human adipose tissue: association with obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*, 50(7), pp.1472–80.
- Den Besten, G. et al., 2015. Short-Chain Fatty Acids protect against High-Fat Diet-Induced Obesity via a PPAR γ -dependent switch from lipogenesis to fat oxidation. *Diabetes*, p.db141213.
- Bik, E.M. et al., 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (3), pp.732–737.
- Bjursell, M. et al., 2011. Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 300(1), pp.E211–E220.
- Bleich, S. et al., 2008. Why is the developed world obese? *Annual review of public health*, 29, pp.273–95.
- Blüher, M. et al., 2013. Fas and FasL expression in human adipose tissue is related to obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 99(1), pp.E36–E44.
- Blüher, M. & Mantzoros, C.S., 2015. From leptin to other adipokines in health and disease: Facts and expectations at the beginning of the 21st century. *Metabolism*, 64(1), pp.131–145.
- Boozar, C.N., Schoenbach, G. & Atkinson, R.L., 1995. Dietary fat and adiposity: a dose-response relationship in adult male rats fed isocalorically. , 268(4), pp.E546–E550.
- Bouskra, D. et al., 2008. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature*, 456(7221), pp.507–510.
- Bowers, L.D. & Sanaullah, 1996. Direct measurement of steroid sulfate and glucuronide conjugates with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 687(1), pp.61–68.
- Bray, G. a, Paeratakul, S. & Popkin, B.M., 2004. Dietary fat and obesity: a review of animal, clinical and epidemiological studies. *Physiology & behavior*, 83(4), pp.549–55.
- Brown, A.J. et al., 2003. The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *Journal of Biological Chemistry*, 278(13), pp.11312–11319.
- Brown, C.T. et al., 2011. Gut microbiome metagenomics analysis suggests a functional model for the development of autoimmunity for type 1 diabetes. *PLoS one*, 6(10), p.e25792.

- Brown, M.S. & Goldstein, J.L., 2008. Selective versus Total Insulin Resistance: A Pathogenic Paradox. *Cell Metabolism*, 7(2), pp.95–96.
- Brunt, E. M. (2010). Pathology of nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 7(4), pp.195-203.
- Buettner, R., Schölmerich, J. & Bollheimer, L.C., 2007. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 15(4), pp.798–808.
- Cabellos-Ruiz, A. et al., 2010. Beyond metagenomics: integration of complementary approaches for the study of microbial communities. *Metagenomics: theory, methods and applications*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, pp.15–37.
- Calder, P.C. et al., 2011. Dietary factors and low-grade inflammation in relation to overweight and obesity. *The British journal of nutrition*, 106 Suppl , pp.S5–78.
- Calvani, R., et al. (2010). Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabolotype. *International Journal of Obesity*, 34(6), pp.1095-1098.
- Cani, P.D. et al., 2009. Changes in gut microbiota control inflammation in obese mice through a mechanism involving GLP-2-driven improvement of gut permeability. *Gut*, 58(8), pp.1091–1103.
- Cani, P.D. et al., 2008. Changes in Gut Microbiota Control Metabolic Endotoxemia-induced Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obesity and Diabetes in Mice. *Diabetes*, 57(June), pp.1470–1481.
- Cani, P.D., 2013. Gut microbiota and obesity: lessons from the microbiome. *Briefings in functional genomics*, 12(4), pp.381–7.
- Cani, P.D. et al., 2007. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 50(11), pp.2374–2383.
- Cani, P.D. & Delzenne, N.M., 2009. Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Current opinion in pharmacology*, 9(6), pp.737–43.
- Cani, P.D. & Delzenne, N.M., 2011. The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacology & therapeutics*, 130(2), pp.202–12.
- Cano, P.G. et al., 2013. Bifidobacterium CECT 7765 improves metabolic and immunological alterations associated with obesity in high-fat diet-fed mice. *Obesity*, 21(11), pp.2310–2321.

- Caricilli, A.M. et al., 2011. Gut microbiota is a key modulator of insulin resistance in TLR 2 knockout mice. *PLoS biology*, 9(12), p.e1001212.
- Cerf-Bensussan, N. & Gaboriau-Routhiau, V., 2010. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nature reviews. Immunology*, 10(10), pp.735–744.
- Cheng, S., et al. (2012). Metabolite profiling identifies pathways associated with metabolic risk in humans. *Circulation*, 125(18), pp.2222–2231.
- Chanséaume, E. et al., 2007. Chronological approach of diet-induced alterations in muscle mitochondrial functions in rats. *Obesity*, 15(1), pp.50–59.
- Le Chatelier, E. et al., 2013. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature*, 500(7464), pp.541–546.
- Cherbuy, C. et al., 2010. Microbiota matures colonic epithelium through a coordinated induction of cell cycle-related proteins in gnotobiotic rat. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 299(2), pp.G348–G357.
- Chiller, K., Selkin, B.A. & Murakawa, G.J., 2001. Skin microflora and bacterial infections of the skin. In *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. Nature Publishing Group, pp. 170–174.
- Chmielewska-Kassassir, M. et al., 2012. [The role of peroxisome proliferator-activated receptors γ (PPAR γ) in obesity and insulin resistance]. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej (Online)*, 67, pp.1283–1299.
- Coate, K.C., Kliewer, S.A. & Mangelsdorf, D.J., 2014. SnapShot: Hormones of the Gastrointestinal Tract. *Cell*, 159(6), p.1478.
- Collins, S. et al., 2004. Genetic vulnerability to diet-induced obesity in the C57BL/6J mouse: physiological and molecular characteristics. *Physiology & behavior*, 81(2), pp.243–248.
- Cotillard, A. et al., 2013. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature*, 500(7464), pp.585–588.
- Cotter, P.D. et al., 2012. The impact of antibiotics on the gut microbiota as revealed by high throughput DNA sequencing. *Discovery medicine*, 13(70), pp.193–199.
- Cummings, J.H. & Macfarlane, G.T., 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology*, 70(6), pp.443–459.
- Daniel, H. et al., 2014. High-fat diet alters gut microbiota physiology in mice. *The ISME journal*, 8(2), pp.295–308.

- Delzenne, N.M. et al., 2011. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(11), pp.639–646.
- Deopurkar, R. et al., 2010. Differential effects of cream, glucose, and orange juice on inflammation, endotoxin, and the expression of Toll-like receptor-4 and suppressor of cytokine signaling-3. *Diabetes care*, 33(5), pp.991–997.
- Dewulf, E.M. et al., 2011. Inulin-type fructans with prebiotic properties counteract GPR43 overexpression and PPAR γ -related adipogenesis in the white adipose tissue of high-fat diet-fed mice. *The Journal of nutritional biochemistry*, 22(8), pp.712–722.
- Dinan, T.G. & Cryan, J.F., 2012. Regulation of the stress response by the gut microbiota: implications for psychoneuroendocrinology. *Psychoneuroendocrinology*, 37(9), pp.1369–1378.
- Duarte, J.A.G. et al., 2014. A high-fat diet suppresses de novo lipogenesis and desaturation but not elongation and triglyceride synthesis in mice. *Journal of lipid research*, 55(12), pp.2541–2553.
- Duca, F. a, Sakar, Y. & Covasa, M., 2013. The modulatory role of high fat feeding on gastrointestinal signals in obesity. *The Journal of nutritional biochemistry*, 24(10), pp.1663–77.
- Duerkop, B.A., Vaishnava, S. & Hooper, L. V, 2009. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity*, 31(3), pp.368–376.
- Duncan, S.H. et al., 2008. Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *International journal of obesity*, 32(11), pp.1720–1724.
- Eckburg, P.B. et al., 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), pp.1635–1638.
- Eckel, R.H., 1992. Insulin resistance: an adaptation for weight maintenance. *The Lancet*, 340, pp.1452–1453.
- Ehrlich, S.D., 2009. Probiotics—little evidence for a link to obesity. *Nature Reviews Microbiology*, 7(12), p.901.
- Emery, C. et al., 2007. Cost of obesity in France. *Presse médicale*, 36(6 Pt 1), pp.832–40. .
- Erridge, C. et al., 2007. A high-fat meal induces low-grade endotoxemia: evidence of a novel mechanism of postprandial inflammation. *The American journal of clinical nutrition*, 86(5), pp.1286–1292.
- Escobedo, G., López-Ortiz, E. & Torres-Castro, I., 2014. Gut microbiota as a key player in triggering obesity, systemic inflammation and insulin resistance. *Revista de investigación clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 66(5), p.450.
- Evans, R. M., et al.. (2004). PPARs and the complex journey to obesity. *Nature medicine*, 10(4), pp.355–361.

- Everard, A., Belzer, C., et al., 2013. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *PNAS*, pp.1–6.
- Everard, A. et al., 2011. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet-induced leptin-resistant mice. *Diabetes*, 60(11), pp.2775–86.
- Everard, A., Sc, M. & Cani, P.D., 2013. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology Diabetes , obesity and gut microbiota. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 27(1), pp.73–83.
- F. Xavier Pi-Sunyer, 1998. Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults *NIH Publication*.
- Farooqi, S. & O'Rahilly, S., 2006. Genetics of obesity in humans. *Endocrine reviews*, 27(7), pp.710–18.
- Faust, K. et al., 2012. Microbial co-occurrence relationships in the human microbiome. *PLoS computational biology*, 8(7), p.e1002606.
- Fei, N. & Zhao, L., 2013. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice. *The ISME journal*, 7(4), pp.880–4.
- Fenn, J.B. et al., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* , 246 (4926), pp.64–71.
- Fenn, J.B. et al., 1990. Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 9(1), pp.37–70.
- Fernández-Veledo, S. et al., 2009. Molecular mechanisms involved in obesity-associated insulin resistance: therapeutical approach. *Archives of physiology and biochemistry*, 115(4), pp.227–239.
- Ferramosca, A. et al., 2014. Differential effects of high-carbohydrate and high-fat diets on hepatic lipogenesis in rats. *European journal of nutrition*, 53(4), pp.1103–1114.
- Finegold, S.M., Attebery, H.R. & Sutter, V.L., 1974. Effect of diet on human fecal flora: comparison of Japanese and American diets¹2.
- Finkelstein, E. a et al., 2009. Annual medical spending attributable to obesity: payer-and service-specific estimates. *Health affairs (Project Hope)*, 28(5), pp.w822–31.
- Finkelstein, E.A. et al., 2015. Obesity and Severe Obesity Forecasts Through 2030. *American Journal of Preventive Medicine*, 42(6), pp.563–570.

- Flint, H.J. et al., 2007. Interactions and competition within the microbial community of the human colon: links between diet and health. *Environmental microbiology*, 9(5), pp.1101–1111.
- Floch, M.H. et al., 2011. Recommendations for probiotic use—2011 update. *Journal of clinical gastroenterology*, 45, pp.S168–S171.
- Fraher, M.H., O'Toole, P.W. & Quigley, E.M.M., 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, 9(6), pp.312–22.
- Frank, D.N. et al., 2007. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), pp.13780–13785.
- Franks, A.H. et al., 1998. Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization with Group-Specific 16S rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes Variations of Bacterial Populations in Human Feces Measured by Fluorescent In Situ Hybridization, 64(9), pp.3336–3345.
- Furet, J. et al., 2010. Differential Adaptation of Human Gut Microbiota to Bariatric Surgery-Induced Weight Loss: Links With Metabolic and Low-Grade Inflammation Markers. *Diabetes*, 59(12), pp.3049–3057.
- Gabert, L. et al., 2011. ¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1, 1, 1-¹³C] tripalmitin and [1, 1, 1-¹³C] triolein. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(19), pp.2697–2703.
- Gao, Z. et al., 2009. Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 58(7), pp.1509–1517.
- Ge, H. et al., 2008. Activation of G protein-coupled receptor 43 in adipocytes leads to inhibition of lipolysis and suppression of plasma free fatty acids. *Endocrinology*, 149(9), pp.4519–4526.
- Gérard, P., Lepercq, P., et al., 2007. Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 73(18), pp.5742–5749.
- Gérard, P., Brézillon, C., et al., 2007. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered Lactobacillus probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 14(1-3), pp.115–122.
- Gérard, P. & Bernalier-Donadille, A., 2007. Les fonctions majeures du microbiote intestinal. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 42, pp.28–36.

- Gerber, M. et al., 2005. Serum resistin levels of obese and lean children and adolescents: biochemical analysis and clinical relevance. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(8), pp.4503–4509.
- Geurts, L. et al., 2011. Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in obese and diabetic leptin-resistant mice: impact on apelin regulation in adipose tissue. *Frontiers in microbiology*, 13(2) pp. 149-166.
- Ghanim, H. et al., 2009. Increase in plasma endotoxin concentrations and the expression of toll-like receptors and suppressor of cytokine signaling-3 in mononuclear cells after a high-fat, high-carbohydrate meal implications for insulin resistance. *Diabetes care*, 32(12), pp.2281–2287.
- Gharibeh, M.Y. et al., 2010. Correlation of plasma resistin with obesity and insulin resistance in type 2 diabetic patients. *Diabetes & metabolism*, 36(6), pp.443–449.
- Ghibaudi, L. et al., 2002. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of sprague-dawley rats. *Obesity research*, 10(9), pp.956–63.
- Ghoshal, K. & Bhattacharyya, M., 2014. Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity.
- Gika, H.G. et al., 2008. Evaluation of the repeatability of ultra-performance liquid chromatography–TOF-MS for global metabolic profiling of human urine samples. *Journal of Chromatography B*, 871(2), pp.299–305.
- Gilbert, M. et al., 2003. Leptin Receptor– Deficient Obese Zucker Rats Reduce Their Food Intake in Response to a Systemic Supply of Calories From Glucose. *Diabetes*, 52(2), pp.277–282.
- Gill, S.R. et al., 2006. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*, 312(5778), pp.1355–1359.
- Giovannoni, S.J. et al., 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton *Nature*, 345 pp. 60-63.
- Girard, J. & Lafontan, M., 2008. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism and insulin resistance. Part II: Visceral adipose tissue production and liver metabolism. *Diabetes & Metabolism*, 34(5), pp.439–445.
- Gniuli, D. et al., 2008. High saturated-fat diet induces apoptosis in rat enterocytes and blunts GIP and insulin-secreting response to oral glucose load. *International Journal of Obesity*, 32(5), pp.871–874.
- Gnudi, L. et al., 1995. High level overexpression of glucose transporter-4 driven by an adipose-specific promoter is maintained in transgenic mice on a high fat diet, but does not prevent impaired glucose tolerance. *Endocrinology*, 136(3), pp.995–1002.

- Gosalbes, M.J. et al., 2011. Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. *PLoS ONE*, 6(3), pp.1–9.
- Gosmain, Y. et al., 2005. Regulation of SREBP-1 expression and transcriptional action on HKII and FAS genes during fasting and refeeding in rat tissues. *Journal of lipid research*, 46(4), pp.697–705.
- Günzel, D., & Fromm, M. (2012). Claudins and other tight junction proteins. *Comprehensive Physiology* 2(3) pp. 819-1852.
- Hageman, R.S. et al., 2010. High-fat diet leads to tissue-specific changes reflecting risk factors for diseases in DBA / 2J mice. *Physiological genomics*, 42(1) pp.55–66.
- Harmsen, H.J.M. et al., 2000. Development of 16S rRNA-based probes for the Coriobacterium group and the Atopobium cluster and their application for enumeration of Coriobacteriaceae in human feces from volunteers of different age groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), pp.4523–4527.
- Harmsen, H.J.M. et al., 2002. Extensive Set of 16S rRNA-Based Probes for Detection of Bacteria in Human Feces. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(6), pp.2982–2990.
- Hayashi, H. et al., 2005. Molecular analysis of jejunal, ileal, caecal and recto-sigmoidal human colonic microbiota using 16S rRNA gene libraries and terminal restriction fragment length polymorphism. *Journal of Medical Microbiology*, 54(11), pp.1093–1101.
- Heilbronn, L.K. & Liu, B., 2014. Do adipose tissue macrophages promote insulin resistance or adipose tissue remodelling in humans? *Hormone molecular biology and clinical investigation*, 20(1), pp.3–13.
- Hermie J. M. Harmsen Frits Schut, Gjalte W. Welling, P.E., 1999. A 16S rRNA-targeted Probe for Detection of Lactobacilli and Enterococci in Faecal Samples by Fluorescent In Situ Hybridization. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 11(1), pp.3–12.
- Hildebrandt, M.A. et al., 2009. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 137(5), pp.1716–1724.
- Hill, M.J., 1997. Intestinal flora and endogenous vitamin synthesis. *European Journal of Cancer Prevention*, 6(2), pp.S43–S45.
- Hong, E.-G. et al., 2009. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes*, 58(11), pp.2525–2535.
- Howard, F.A.C. & Henderson, C., 1999. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by human colonic bacteria. *Letters in applied microbiology*, 29(3), pp.193–196.

- Huang, Y.J. et al., 2011. Airway microbiota and bronchial hyperresponsiveness in patients with suboptimally controlled asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 127(2), pp.372–381.
- Huse, S.M. et al., 2012. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PloS one*, 7(6), p.e34242.
- Iqbal, N. et al., 2005. Serum resistin is not associated with obesity or insulin resistance in humans. *European review for medical and pharmacological sciences*, 9(3), p.161-165.
- Jakobsdottir, G. et al. (2013). High-fat diet reduces the formation of butyrate, but increases succinate, inflammation, liver fat and cholesterol in rats, while dietary fibre counteracts these effects. *PloS one*, 8(11), e80476.
- Jansson, J. et al., 2009. Metabolomics Reveals Metabolic Biomarkers of Crohn's Disease. *PLoS ONE*, 4(7), p.e6386.
- Jeffery, I.B. et al., 2012. An irritable bowel syndrome subtype defined by species-specific alterations in faecal microbiota. *Gut*, 61(7), pp.997–1006.
- Jeffery, I.B. et al., 2012. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nature Reviews Microbiology*, 10(9), pp.591–592.
- Jensen-Urstad, A. P., & Semenkovich, C. F. (2012). Fatty acid synthase and liver triglyceride metabolism: housekeeper or messenger?. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821(5), pp.747-753.
- Jeon, T.-I. & Osborne, T.F., 2012. SREBPs: metabolic integrators in physiology and metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 23(2), pp.65–72.
- Jernberg, C. et al., 2010. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*, 156(11), pp.3216–3223.
- Jiménez, E. et al., 2008. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*, 159(3), pp.187–193.
- Jia, J. J. et al. (2009). The polymorphisms of UCP2 and UCP3 genes associated with fat metabolism, obesity and diabetes. *Obesity Reviews*, 10(5), pp.519-526.
- Jiménez, E. et al., 2005. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current microbiology*, 51(4), pp.270–274.
- Joos, T.O., Stoll, D. & Templin, M.F., 2002. Miniaturised multiplexed immunoassays. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6(1), pp.76–80.

- Jornayvaz, F.R. & Shulman, G.I., 2010. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays Biochem*, 47, pp.69–84.
- Jurgens, G., Lindström, K. & Saano, A., 1997. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), pp.803–805.
- Kalupahana, N.S., Claycombe, K.J. & Moustaid-Moussa, N., 2011. (n-3) Fatty acids alleviate adipose tissue inflammation and insulin resistance: mechanistic insights. *Adv Nutr*, 2(4), pp.304–316.
- Kamada, N., Chen, G.Y., et al., 2013. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Cancer*, 14(7), pp.685–690.
- Kamada, N., Seo, S.-U., et al., 2013. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature reviews. Immunology*, 13(5), pp.321–35.
- Kanda, H. et al., 2006. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue , insulin resistance , and hepatic steatosis in obesity., 116(6) pp. 1494-1505.
- Kanehisa, M. et al., 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32(1), pp.D277–D280.
- Kaur, N. et al., 2011. Intestinal dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut microbes*, 2(4), pp.211–216.
- Kawano, Y. & Cohen, D.E., 2013. Mechanisms of hepatic triglyceride accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*, 48(4), pp.434–441.
- Kell, D.B., 2004. Metabolomics and systems biology: making sense of the soup. *Current opinion in microbiology*, 7(3), pp.296–307.
- Keller, M. & Hettich, R., 2009. Environmental proteomics: a paradigm shift in characterizing microbial activities at the molecular level. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(1), pp.62–70.
- Kelly, M. et al., 2009. Activation of AMP-Activated Protein Kinase by Interleukin-6 in Rat Skeletal Muscle Association With Changes in cAMP, Energy State, and Endogenous Fuel Mobilization. *Diabetes*, 58(9), pp.1953–1960.
- Kelly, O.J. et al., 2015. Long-chain polyunsaturated fatty acids may mutually benefit both obesity and osteoporosis. *Nutrition Research*, 33(7), pp.521–533
- Khan, M. & Joseph, F., 2014. Adipose Tissue and Adipokines: The Association with and Application of Adipokines in Obesity. *Scientifica*, 2014.

- Kim, S.-W. et al., 2013. Lactobacillus rhamnosus GG improves insulin sensitivity and reduces adiposity in high-fat diet-fed mice through enhancement of adiponectin production. *Biochemical and biophysical research communications*, 431(2), pp.258–263.
- Kim, Y.J. & Park, T., 2008. Genes are differentially expressed in the epididymal fat of rats rendered obese by a high-fat diet. *Nutrition Research*, 28(6), pp.414–422.
- Kimura, I. et al., 2013. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nature communications*, 4, p.1829.
- Klaassens, E.S. et al., 2009. Mixed-species genomic microarray analysis of fecal samples reveals differential transcriptional responses of bifidobacteria in breast-and formula-fed infants. *Applied and environmental microbiology*, 75(9), pp.2668–2676.
- Klaassens, E.S., De Vos, W.M. & Vaughan, E.E., 2007. Metaproteomics approach to study the functionality of the microbiota in the human infant gastrointestinal tract. *Applied and environmental microbiology*, 73(4), pp.1388–1392.
- Van der Kloet, F.M. et al., 2009. Analytical Error Reduction Using Single Point Calibration for Accurate and Precise Metabolomic Phenotyping. *Journal of Proteome Research*, 8(11), pp.5132–5141.
- Kozimor, A., Chang, H. & Cooper, J.A., 2013. Effects of dietary fatty acid composition from a high fat meal on satiety. *Appetite*, 69, pp.39–45.
- Kuhl, C. et al., 2012. CAMERA: An Integrated Strategy for Compound Spectra Extraction and Annotation of Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Data Sets. *Analytical Chemistry*, 84(1), pp.283–289.
- Kwon, E. et al., 2012. Time-course microarrays reveal early activation of the immune transcriptome and adipokine dysregulation leads to fibrosis in visceral adipose depots during diet-induced obesity. *BMC Genomics*, 13(1), p.450.
- Lambert, J.E. et al., 2014. Increased de novo lipogenesis is a distinct characteristic of individuals with nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*, 146(3), pp.726–735.
- Langendijk, P.S. et al., 1995. Quantitative fluorescence in situ hybridization of Bifidobacterium spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(8), pp.3069–3075.
- Larsen, N. et al., 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS one*, 5(2), p.e9085.

- Lay, C. et al., 2005. Colonic Microbiota Signatures across Five Northern European Countries Colonic Microbiota Signatures across Five Northern European Countries. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(7), p.4153.
- Lee, J.H. et al., 2003. Circulating resistin levels are not associated with obesity or insulin resistance in humans and are not regulated by fasting or leptin administration: cross-sectional and interventional studies in normal, insulin-resistant, and diabetic subjects. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 88(10), pp.4848–4856.
- Letexier, D. et al., 2003. Comparison of the expression and activity of the lipogenic pathway in human and rat adipose tissue. *Journal of Lipid Research*, 44 (11), pp.2127–2134.
- Ley, R.E. et al., 2006. Human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444, pp.1022–1023.
- Ley, R.E. et al., 2005. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), pp.11070–11075.
- Li, L. et al., 2005. High-fat-and lipid-induced insulin resistance in rats: the comparison of glucose metabolism, plasma resistin and adiponectin levels. *Annals of nutrition & metabolism*, 50(6), pp.499–505.
- Lin, H. V et al., 2012. Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms., 7(4), pp.1–9.
- Lin, S. et al., 2000. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 24(5), pp.639–646.
- Liu, H.-Q. et al., 2013. A high ratio of dietary n-3/n-6 polyunsaturated fatty acids improves obesity-linked inflammation and insulin resistance through suppressing activation of TLR4 in SD rats. *Nutrition research*, 33(10), pp.849–858.
- Liu, W.-T. et al., 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 63(11), pp.4516–4522.
- Logue, J. & Sattar, N., 2013. Body weight and mortality in type 2 diabetes: weighing up the evidence. *Diabetes & metabolism*, 39(4), pp.287–8..
- Lorente-Cebrián, S. et al., 2013. Role of omega-3 fatty acids in obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases: a review of the evidence. *Journal of physiology and biochemistry*, 69(3), pp.633–651.

- Louie, S.M., Roberts, L.S. & Nomura, D.K., 2013. Mechanisms linking obesity and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(10), pp.1499–1508.
- Louis, P., et al. (2010). Diversity of human colonic butyrate-producing bacteria revealed by analysis of the butyryl-CoA: acetate CoA-transferase gene. *Environmental microbiology*, 12(2), pp.304–314.
- Lumeng, C.N. et al., 2007. Increased Inflammatory Properties of Adipose Tissue Macrophages Recruited During Diet-Induced Obesity. , 56(1) pp.16–23.
- M Lenhard, J., 2011. Lipogenic enzymes as therapeutic targets for obesity and diabetes. *Current pharmaceutical design*, 17(4), pp.325–331.
- Macpherson, A.J. & Harris, N.L., 2004. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nature reviews. Immunology*, 4(6), pp.478–85.
- Madsen, L., Petersen, R.K. & Kristiansen, K., 2005. Regulation of adipocyte differentiation and function by polyunsaturated fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1740(2), pp.266–286.
- Magalhaes, J.G., Tattoli, I. & Girardin, S.E., 2007. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Seminars in immunology*. Elsevier, pp. 106–115.
- Mahowald, M.A. et al., 2009. Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(14), pp.5859–5864.
- Major, H.J. et al., 2006. A metabonomic analysis of plasma from Zucker rat strains using gas chromatography/mass spectrometry and pattern recognition. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 20(22), pp.3295–3302.
- Manichanh, C. et al., 2006. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*, 55(2), pp.205–211.
- Manz, W. et al., 1996. Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology*, 142(1 996), pp.1097–1106.
- Mariat, D. et al., 2009. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC microbiology*, 9(1), p.123.
- Marić, G. et al., 2014. The role of gut hormones in appetite regulation (review). *Acta Physiologica Hungarica*, 101(4), pp.395–407.

- Martin, H., 2009. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 669(1), pp.1–7.
- Martínez, I., Muller, C.E. & Walter, J., 2013. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. *PLoS one*, 8(7), p.e69621.
- Maryam Ahmadian, 2013. PPARG signaling and metabolism: the good, the bad, and the future. *Nature Medicine*, 99(5) pp. 557-566.
- Masgrau, A. et al., 2012. Time-course changes of muscle protein synthesis associated with obesity-induced lipotoxicity. *The Journal of physiology*, 590(20), pp.5199–5210.
- Maslowski, K.M. et al., 2009. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 461(7268), pp.1282–1286.
- Mathieu, P., et al. 2010. Obesity, Inflammation, and Cardiovascular Risk. *Clin Pharmacol Ther*, 87(4), pp.407–416.
- Maynard, C.L. et al., 2012. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), pp.231–241.
- Mazmanian, S.K. et al., 2005. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, 122(1), pp.107–118.
- McArdle, M. a. et al., 2013. Mechanisms of obesity-induced inflammation and insulin resistance: Insights into the emerging role of nutritional strategies. *Frontiers in Endocrinology*, 4(May), pp.1–23.
- Membrez, M. et al., 2008. Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *The FASEB Journal*, 22(7), pp.2416–2426.
- Menendez, J. A. et al. 2009. Fatty acid synthase: association with insulin resistance, type 2 diabetes, and cancer. *Clinical chemistry*, 55(3), pp.425-438
- Mickelsen, O. & Takaiishi, S., 1955. Experimental Obesity: I. Production of Obesity in Rats by Feeding High-Fat Diets. *Journal of Nutrition*, 57(4), pp.541–554.
- Mimaki, M., et al. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1817(6), pp.851-862
- Miquilena-Colina, M. E., et al. (2011). Hepatic fatty acid translocase CD36 upregulation is associated with insulin resistance, hyperinsulinaemia and increased steatosis in non-alcoholic steatohepatitis and chronic hepatitis C. *Gut*, 60(10), pp.1394-1402.

- Montgomery, M.K. et al., 2013. Mouse strain-dependent variation in obesity and glucose homeostasis in response to high-fat feeding. *Diabetologia*, 56(5), pp.1129–1139.
- Moraes, R.C. et al., 2003. Study of the alteration of gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice by microarray and reverse transcription-polymerase chain reaction analyses. *Endocrinology*, 144(11), pp.4773–82.
- Moran, O. & Phillip, M., 2003. Leptin: obesity, diabetes and other peripheral effects—a review. *Pediatric diabetes*, 4(2), pp.101–109.
- Morinaga, H. et al., 2012. Increased macrophage migration into adipose tissue in obese mice. *Diabetes*, 61(2), pp.346–354.
- Morris, M., & Watkins, S. M. (2005). Focused metabolomic profiling in the drug development process: advances from lipid profiling. *Current opinion in chemical biology*, 9(4), 407-412.
- Morris, C., et al. (2012). The relationship between BMI and metabolomic profiles: a focus on amino acids. *Proceedings of the Nutrition Society*, 71(04), pp.634-638.
- Moro, C., 2012. Modulations physiologiques et physiopathologiques de la lipolyse chez l'homme. *Cahiers de Nutrition et de Diététique*, 47(5), pp.227–233.
- Moussavi, N., Gavino, V. & Receveur, O., 2008. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 16(1), pp.7–15.
- Mowat, A.M., 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature reviews. Immunology*, 3(4), pp.331–41.
- Muccioli, G.G. et al., 2010. The endocannabinoid system links gut microbiota to adipogenesis. *Molecular systems biology*, 6(1), p.392-407.
- Muhlhauser, B.S. & Ailhaud, G.P., 2013. Omega-6 polyunsaturated fatty acids and the early origins of obesity. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 20(1), pp.56–61.
- Munro, I.A. & Garg, M.L., 2012. Dietary supplementation with n-3 PUFA does not promote weight loss when combined with a very-low-energy diet. *British Journal of Nutrition*, 108(08), pp.1466–1474.
- Murphy, E.F. et al., 2010. Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota : relationship to diet , obesity and time in mouse models. , pp.1635–1643.
- Al Mushref, M. & Srinivasan, S., 2013. Effect of high fat-diet and obesity on gastrointestinal motility. *Annals of translational medicine*, 1(2), p.14.

- Musso, G., Gambino, R. & Cassader, M., 2009. Progress in Lipid Research Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Progress in Lipid Research*, 48(1), pp.1–26.
- Neish, A.S., 2009. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), pp.65–80.
- Neyrinck, A.M. et al., 2011. Prebiotic effects of wheat arabinoxylan related to the increase in bifidobacteria, Roseburia and Bacteroides/Prevotella in diet-induced obese mice. *PLoS One*, 6(6), p.e20944.
- Ng, M. et al., 2014. Global , regional , and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980 – 2013 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. , 384.
- Nielsen, H.B. et al., 2014. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nature biotechnology*, 32(8), pp.822–828.
- Nogueiras, R. et al., 2003. Resistin is expressed in different rat tissues and is regulated in a tissue-and gender-specific manner. *FEBS letters*, 548(1), pp.21–27.
- Noor, S.O. et al., 2010. Ulcerative colitis and irritable bowel patients exhibit distinct abnormalities of the gut microbiota. *BMC gastroenterology*, 10(1), p.134.
- Oberbach, A., et al. (2011). Combined proteomic and metabolomic profiling of serum reveals association of the complement system with obesity and identifies novel markers of body fat mass changes. *Journal of proteome research*, 10(10), pp.4769-4788.
- Ortega, F.J. et al., 2009. The Gene Expression of the Main Lipogenic Enzymes is Downregulated in Visceral adipose Tissue of Obese Subjects. *Obesity*, 18(1), pp.13–20.
- Osborne, T.F., 2000. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *Journal of biological chemistry*, 275(42), pp.32379–32382.
- Ottenstein, D.M. & Bartley, D.A., 1971. Improved gas chromatography separation of free acids C2-C5 in dilute solution. *Analytical Chemistry*, 43(7), pp.952–955.
- Palmer, C. et al., 2007. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS biology*, 5(7), p.e177.
- Palmer, C. et al., 2006. Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Research*, 34(1), pp.e5–e5.
- Park, H.K. & Ahima, R.S., 2013. Resistin in Rodents and Humans, *Diabetes & metabolism journal*, 37(6), pp.404–414.

- Park, S. et al., 2005. Unraveling the Temporal Pattern of Diet-Induced Insulin in C57BL/6 Mice *Diabetes*, 54(12), pp. 3530-3540.
- Parnell, J.A. & Reimer, R.A., 2009. Weight loss during oligofructose supplementation is associated with decreased ghrelin and increased peptide YY in overweight and obese adults. *The American journal of clinical nutrition*, 89(6), pp.1751–1759.
- Peris-Bondia, F. et al., 2011. The active human gut microbiota differs from the total microbiota. *PloS one*, 6(7), p.e22448.
- Perry, R.J. et al., 2014. The role of hepatic lipids in hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, 510(7503), pp.84–91.
- Peterson, D. a et al., 2008. Metagenomic approaches for defining the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Cell host & microbe*, 3(6), pp.417–27.
- Petit, V. et al., 2007. Chronic high-fat diet affects intestinal fat absorption and postprandial triglyceride levels in the mouse. *Journal of lipid research*, 48(2), pp.278–87.
- Petrova, M.I. et al., 2013. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS microbiology reviews*, 37(5), pp.762–792.
- PF, F., 1951. The Nutrition of the Mouse: XI. Response of Four Strains to Diets Differing in Fat Content. *JC Carr*, 45(2), pp.225–233.
- Le Poul, E. et al., 2003. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(28), pp.25481–25489.
- Pritchard, L.E., Turnbull, A. V & White, A., 2002. Pro-opiomelanocortin processing in the hypothalamus: impact on melanocortin signalling and obesity. *Journal of Endocrinology*, 172(3), pp.411–421.
- Proenca, A.R.G. et al., 2014. New concepts in white adipose tissue physiology. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(3), pp.192–205.
- Pryde, S.E. et al., 2002. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS Microbiology Letters*, 217, pp.133–139.
- Purchiaroni, F. et al., 2013. The role of intestinal microbiota and the immune system. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17(3), pp.323–333.
- Qatanani, M. et al., 2009. Macrophage-derived human resistin exacerbates adipose tissue inflammation and insulin resistance in mice. *The Journal of clinical investigation*, 119(3), p.531.

- Qi, Q. et al., 2012. Genome-wide association analysis identifies TYW3/CRYZ and NDST4 loci associated with circulating resistin levels. *Human molecular genetics*, p.dds300.
- Qin, J. et al., 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464(7285), pp.59–65.
- Rabot, S. et al., 2010. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(12), pp.4948–4959.
- Rajala, M.W. et al., 2004. Regulation of resistin expression and circulating levels in obesity, diabetes, and fasting. *Diabetes*, 53(7), pp.1671–1679.
- Ravussin, Y. et al., (2012). Responses of gut microbiota to diet composition and weight loss in lean and obese mice. *Obesity*, 20(4), pp.738–747.
- Respondek, F. et al., 2013. Short-chain fructo-oligosaccharides modulate intestinal microbiota and metabolic parameters of humanized gnotobiotic diet induced obesity mice. *PloS one*, 8(8), p.e71026.
- Ribot, J. et al., 2001. Weight loss reduces expression of SREBP1c/ADD1 and PPAR γ 2 in adipose tissue of obese women. *Pflügers Archiv*, 441(4), pp.498–505.
- Ridaura, V.K. et al., 2014. Gut Microbiota from Twins Discordant for Obesity Modulate Metabolism in Mice. *Science*, 341(6150), p. 1241214.
- Ridlon, J.M., Kang, D.-J. & Hylemon, P.B., 2006. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of lipid research*, 47(2), pp.241–259.
- Rigottier-Gois, L. et al., 2003. Fluorescent hybridisation combined with flow cytometry and hybridisation of total RNA to analyse the composition of microbial communities in human faeces using 16S rRNA probes. *FEMS microbiology ecology*, 43(2), pp.237–45.
- Roberfroid, M. et al., 2010. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104(S2), pp.S1–S63.
- Rodriguez-Pacheco, F. et al., 2013. Resistin regulates pituitary lipid metabolism and inflammation in vivo and in vitro. *Mediators of inflammation*, vol 2013
- Romeo, G. R., Lee, J., & Shoelson, S. E 2012. Metabolic syndrome, insulin resistance, and roles of inflammation—mechanisms and therapeutic targets. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 32(8), pp.1771–1776

- Ronti, T., Lupattelli, G. & Mannarino, E., 2006. The endocrine function of adipose tissue : an update. *Clinical Endocrinology*, pp.355–365.
- Round, J.L. & Mazmanian, S.K., 2009. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 9(5), pp.313–323.
- Le Roux, C.W. et al., 2006. Attenuated peptide YY release in obese subjects is associated with reduced satiety. *Endocrinology*, 147(1), pp.3–8.
- Roy, T. Le et al., 2012. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Blood*, pp.1–8.
- Ryan, S., Crinion, S.J. & McNicholas, W.T., 2014. Obesity and sleep-disordered breathing—when two “bad guys” meet. *QJM*, 107(12), pp.949–954.
- Sáinz, N. et al., 2015. Leptin resistance and diet-induced obesity: central and peripheral actions of leptin. *Metabolism*, 64(1), pp.35–46.
- Saltiel, A.R. & Kahn, C.R., 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 414(December), pp.799–806.
- Salzman, N.H. et al., 2002. Analysis of 16S libraries of mouse gastrointestinal microflora reveals a large new group of mouse intestinal bacteria. *Microbiology*, 148, pp.3651–3660.
- Samuel, B.S. et al., 2008. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), pp.16767–72.
- Samuel, V. T., & Shulman, G. I., 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell*, 148(5), pp.852–871.
- Sartor, R.B., 2008. Microbial Influences in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*, pp.577–594.
- Satoh, N. et al., 1998. Satiety effect and sympathetic activation of leptin are mediated by hypothalamic melanocortin system. *Neuroscience Letters*, 249(2–3), pp.107–110.
- Savage, D.C., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Reviews in Microbiology*, 31(1), pp.107–133.
- Scheele, C. et al., 2012. Satellite cells derived from obese humans with type 2 diabetes and differentiated into myocytes in vitro exhibit abnormal response to IL-6. *PLoS one*, 7(6), p.e39657.
- Schmiel, D.H. & Miller, V.L., 1999. Bacterial phospholipases and pathogenesis. *Microbes and infection*, 1(13), pp.1103–1112.

- Schroeder, A. et al., 2006. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC molecular biology*, 7, p.3.
- Schwartz, D.R. & Lazar, M.A., 2011. Human resistin: found in translation from mouse to man. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 22(7), pp.259–265.
- Schwiertz, A. et al., 2010. Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 18(1), pp.190–195.
- Scott, K.P. et al., 2013. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 69(1), pp.52–60.
- Šefčíková, Z. et al., 2008. Different functional responsibility of the small intestine to high-fat/high-energy diet determined the expression of obesity-prone and obesity-resistant phenotypes in rats. *Physiol Res*, 57, pp.467–474.
- Sekirov, I. et al., 2010. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(3) pp.859–904.
- Seksik, P., 2010. Gut microbiota and IBD. *Gastroenterologie clinique et biologique*, vol 34, pp.S44–S51.
- Serino, M. et al., 2012. Metabolic adaptation to a high-fat diet is associated with a change in the gut microbiota. *Gut*, 61(4), pp.543–53.
- Sghir, A. et al., 2000. Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), pp.2263–2266.
- Sina, C. et al., 2009. G protein-coupled receptor 43 is essential for neutrophil recruitment during intestinal inflammation. *The Journal of Immunology*, 183(11), pp.7514–7522.
- Smith, C.A. et al., 2006. XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), pp.779–787.
- Sokol, H. et al., 2009. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflammatory bowel diseases*, 15(8), pp.1183–1189.
- Soronen, J. et al., 2012. Adipose tissue gene expression analysis reveals changes in inflammatory, mitochondrial respiratory and lipid metabolic pathways in obese insulin-resistant subjects. *BMC medical genomics*, 5(1), p.9.
- Sparks, L. et al. (2005). A high-fat diet coordinately downregulates genes required for mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle. *Diabetes*, 54(7), pp.1926–1933.
- Spatharou et al. , 2014. Overcoming obesity : An initial economic analysis McKinsey Global Institute.

- Speakman, J. et al., 2008. The contribution of animal models to the study of obesity. *Laboratory Animals*, 42 (4), pp.413–432.
- Stappenbeck, T.S., Hooper, L. V & Gordon, J.I., 2002. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), pp.15451–15455.
- Stenman, L.K., Holma, R. & Korpela, R., 2012. High-fat-induced intestinal permeability dysfunction associated with altered fecal bile acids. *World journal of gastroenterology: WJG*, 18(9), p.923.
- Steppan, C.M. et al., 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature*, 409(6818), pp.307–12
- Stewart, F.J., Ottesen, E.A. & DeLong, E.F., 2010. Development and quantitative analyses of a universal rRNA-subtraction protocol for microbial metatranscriptomics. *The ISME journal*, 4(7), pp.896–907.
- Stratigopoulos, G. et al., 2008. Regulation of Fto/Ftm gene expression in mice and humans. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 294(4), pp.R1185–R1196.
- Strober, W., 2011. Adherent-invasive E. coli in Crohn disease: bacterial “agent provocateur.” *The Journal of clinical investigation*, 121(3), p.841.
- Suau, A. et al., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 65(11), pp.4799–4807.
- Sun, K., Kusminski, C.M. & Scherer, P.E., 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), p.2094.
- Szylit, O. et al., 1988. Production of volatile fatty acids as a result of bacterial interactions in the cecum of gnotobiotic rats and chickens fed a lactose-containing diet. *Reprod. Nutr. Dévelop.*, 28(6A), pp.1455–1464.
- Tagliaferri, C. et al., 2014. Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *European journal of nutrition*, pp.1–11.
- Takemura, N., Okubo, T. & Sonoyama, K., 2010. Lactobacillus plantarum strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Experimental biology and medicine*, 235(7), pp.849–856.
- Tap, J. et al., 2009. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environmental Microbiology*, 11, pp.2574–2584.

- Tardif, N. et al., 2014. Muscle ectopic fat deposition contributes to anabolic resistance in obese sarcopenic old rats through eIF2 α activation. *Aging cell*, 13(6), pp.1001–1011.
- Tatusov, R. et al., 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4(1), p.41
- Tautenhahn, R., Böttcher, C. & Neumann, S., 2008. Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC bioinformatics*, 9(1), p.504.
- Tazoe, H. et al., 2009. Expression of short-chain fatty acid receptor GPR41 in the human colon. *Biomedical Research*, 30(3), pp.149–156.
- Tchernof, A., & Després, J. P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: an update. *Physiological reviews*, 93(1), pp.359-404.
- Teng, K.-T. et al., 2014. Modulation of obesity-induced inflammation by dietary fats: mechanisms and clinical evidence. *Nutrition Journal*, 13(1), p.12.
- The Human Microbiome Project, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 486 (7402) pp. 207-214.
- Tims, S. et al., 2013. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME journal*, 7(4), pp.707–17.
- Todoric, J. et al., 2006. Adipose tissue inflammation induced by high-fat diet in obese diabetic mice is prevented by n-3 polyunsaturated fatty acids. *Diabetologia*, 49, pp.2109–2119.
- Tolhurst, G. et al., 2012. Short-chain fatty acids stimulate glucagon-like peptide-1 secretion via the G-protein–coupled receptor FFAR2. *Diabetes*, 61(2), pp.364–371.
- Tremblay, A.J. et al., 2013. Short-term, high-fat diet increases the expression of key intestinal genes involved in lipoprotein metabolism in healthy men. *The American journal of clinical nutrition*, 98(1), pp.32–41.
- Turnbaugh, P.J., Hamady, M., et al., 2009. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*, 457(7228), pp.480–4.
- Turnbaugh, P.J. et al., 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 444(7122), pp.1027–1031.
- Turnbaugh, P.J. et al., 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe*, 3(4), pp.213–23.

- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., et al., 2009. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Science translational medicine*, 1(6), pp.6ra14–6ra14.
- Uysal, K.T. et al., 1997. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature*, 389(6651), pp.610–614.
- Veiga, P. et al., 2005. Correlation between faecal microbial community structure and cholesterol-to-coprostanol conversion in the human gut. *FEMS microbiology letters*, 242(1), pp.81–86.
- Verdu, E.F. et al., 2006. Specific probiotic therapy attenuates antibiotic induced visceral hypersensitivity in mice. *Gut*, 55(2), pp.182–190.
- Vignali, D.A.A., 2000. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of Immunological Methods*, 243(1–2), pp.243–255.
- Vigsnaes, L.K. et al., 2013. Microbiotas from UC patients display altered metabolism and reduced ability of LAB to colonize mucus. *Scientific reports*, vol 3.
- Vijay-Kumar, M. et al., 2010. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science (New York, N.Y.)*, 328(5975), pp.228–31.
- Van Vliet, A.H.M., 2010. Next generation sequencing of microbial transcriptomes: challenges and opportunities. *FEMS microbiology letters*, 302(1), pp.1–7.
- De Vos, W.M., 2009. Mining the microbes—the human microbiome as model. *Microbial biotechnology*, 2(2), pp.153–154.
- Vrieze, a et al., 2010. The environment within: how gut microbiota may influence metabolism and body composition. *Diabetologia*, 53(4), pp.606–13.
- Vrieze, A. et al., 2012. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology*, 143(4), pp.913–916.
- Walker, A.W. et al., 2011. High-throughput clone library analysis of the mucosa-associated microbiota reveals dysbiosis and differences between inflamed and non-inflamed regions of the intestine in inflammatory bowel disease. *BMC microbiology*, 11(1), p.7.
- Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W., 1993. Optimizing Fluorescent In Situ Hybridization With rRNA-Targeted Oligonucleotide Probes for Flow Cytometric Identification of Microorganisms. *Journal of General Microbiology*, 143, pp.136–143.

- Wallner, G., Amann, R. & Beisker, W., 1993. Optimizing fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 14(2), pp.136–43.
- Wang, L.-X. et al., 2013. Protective effects of two *Lactobacillus plantarum* strains in hyperlipidemic mice. *World journal of gastroenterology: WJG*, 19(20), p.3150.
- West, D.B. et al., 1992. Dietary obesity in nine inbred mouse strains. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 262(6), pp.R1025–R1032.
- White, U.A. & Stephens, J.M., 2010. Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Molecular and cellular endocrinology*, 318(1), pp.10–14.
- Wikoff, W.R. et al., 2009. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(10), pp.3698–703.
- Wilkins, T.D. & Hackman, A.S., 1974. Two patterns of neutral steroid conversion in the feces of normal North Americans. *Cancer research*, 34(9), pp.2250–2254.
- Williams, R. et al., 2006. A multi-analytical platform approach to the metabonomic analysis of plasma from normal and Zucker (fa/fa) obese rats. *Molecular bioSystems*, 2, pp.174–183.
- Wiśniewski, J.R. et al., 2015. The Impact of High-Fat Diet on Metabolism and Immune Defense in Small Intestine Mucosa. *Journal of Proteome Research*, 14(1), pp.353–365.
- De Wit, N.J. et al., 2008. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC medical genomics*, 1, p.14.
- De Wit, N. J., et al. (2011). Dose-dependent effects of dietary fat on development of obesity in relation to intestinal differential gene expression in C57BL/6J mice. *PLoS One*, 6(4), e19145.
- Withrow, D. & Alter, D. a, 2011. The economic burden of obesity worldwide: a systematic review of the direct costs of obesity. *Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity*, 12(2), pp.131–41.
- Wold, S., Sjöström, M. & Eriksson, L., 2002. Partial Least Squares Projections to Latent Structures (PLS) in Chemistry. *Encyclopedia of Computational Chemistry*.
- Wronska, A. & Kmiec, Z., 2012 Structural and biochemical characteristics of various white adipose tissue depots. *Acta physiologica* 205(2) pp.194-208

- Wrzosek, L. et al., 2013. Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC biology*, 11(1), p.61.
- Wu, G.D. et al., 2011. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6052), pp.105–108.
- Wu, X. et al., 2010. Molecular characterisation of the faecal microbiota in patients with type II diabetes. *Current microbiology*, 61(1), pp.69–78.
- Xu, H. et al., 2003. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*, 112(12), p.1821.
- Xu, J. & Gordon, J.I., 2003. Honor thy symbionts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(18), pp.10452–9.
- Xu, X. et al., 2013. Gut microbiota , host health , and polysaccharides. *Biotechnology Advances*, 31(2), pp.318–337..
- Xue, L. et al., 2015. Significance of resistin expression in acute pancreatitis. *Experimental and therapeutic medicine*, 9(4), pp.1438–1442.
- Yadav, A. et al., 2013. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. *Clinica Chimica Acta*, 417, pp.80–84.
- Yamashita, H. et al., 2007. Improvement of obesity and glucose tolerance by acetate in Type 2 diabetic Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 71(5), pp.1236–1243.
- Yatsunencko, T. et al., 2012. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature*, 486(7402), pp.222–227.
- Ye, H. et al., 2013. Resistin production from adipose tissue is decreased in db/db obese mice, and is reversed by rosiglitazone. *PloS one*, 8(6), p.e65543.
- Yki-Järvinen, H., 2014. Non-alcoholic fatty liver disease as a cause and a consequence of metabolic syndrome. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2(11), pp.901–910.
- Zaibi, M.S. et al., 2010. Roles of GPR41 and GPR43 in leptin secretory responses of murine adipocytes to short chain fatty acids. *FEBS letters*, 584(11), pp.2381–2386.
- Zhang, Y. et al., 1994. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *nature*, 372(6505), pp.425–432.

- Zhang, S., et al. (2014). The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility. *Nutr Metab (Lond)*, 11(10).
- Zoetendal, E.G. et al., 2004. Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review. *The Journal of nutrition*, 134(2), pp.465–472.
- Zoetendal, E.G., Akkermans, a D. & De Vos, W.M., 1998. Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 64(10), pp.3854–9.